

**Tierexperimentelle Studie zur Beeinflussung
der Implantatosseointegration durch Oberflä-
chenbeschichtungen mit Kollagen sowie proli-
ferativen und osteoinduktiven Zytokinen**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

Doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich Schiller-Universität Jena

von Dr. med. Michelle Klos, geb. Schmidt
geboren am 20.02.1977 in Bergheim (Erft)

Gutachter

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Meiner Lilly & Sophie

I. Abkürzungsverzeichnis

ANOF	anodische Oxidation unter Funkenentladung
aqua dest.	aqua destillata
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BIC	bone implant contact
BMP	Bone Morphogenic Proteins
coll	Kollagen
coll/bFGF	Kollagen + bFGF
coll/VEGF ₁₆₅	Kollagen + VEGF ₁₆₅
coll/rhBMP2	Kollagen + rhBMP2
coll/3er-combi	Kollagen + bFGF, VEGF ₁₆₅ und rhBMP2
cpTi	commercially pure Titan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FGF	Fibroblaste Growth Factor
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF	Insulinlike Growth Factor
i. m.	intramuskulär
ITN	Intubationsnarkose
i. v.	intravenös
MMA	Methylmethacrylat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
postop.	postoperativ
rhBMP	recombinant human Bone Morphogenetic Protein
TGFβ	Transforming Growth Factor
TPS	Titanplasmabeschichtung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	I
II.	Inhaltsverzeichnis	II
III.	Vorbemerkung	IV
IV.	Zusammenfassung	V
1.	Einleitung	1
	1.1 Allgemeine Grundlagen der dentalen Implantologie	1
	1.2 Implantatmaterial	2
	1.3 Makrodesign	3
	1.4 Mikrodesign	3
	1.5 Implantatbeschichtungsverfahren	4
	1.5.1 Konventionelle Methoden zur Implantatbeschichtung	4
	1.5.2 Implantatbeschichtungen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix und Zytokinen	4
2.	Ziel der Arbeit	6
3.	Material und Methoden	7
	3.1 Implantat	7
	3.2 Tiermodell	7
	3.3 Implantatbeschichtungen	8
	3.3.1 bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)	8
	3.3.2 VEGF-A ₁₆₅ (Vascular Endothelial Growth Factor)	9
	3.3.3 rhBMP2 (recombinant human Bone Morphogenetic Protein)	9
	3.3.4 Implantatbeschichtung	10
	3.4 Versuchsgruppen	12
	3.5 Chirurgisches Vorgehen und postoperativer Ablauf	13
	3.6 Poychrome Sequenzmarkierung (Injektion)	15
	3.7 Opferung der Tiere	16
	3.8 Entnahme und Aufbereitung der Prüfkörper	16
	3.9 Polychrome Sequenzmarkierung (Auswertung)	19

3.10 Histomorphometrie	19
3.10.1 Herstellung der Stammlösungen für die Masson-Trichrom-Goldner-Färbung	20
3.11 Immunhistochemie	21
3.12 Mikroradiographie	25
3.13 Statistische Tests	25
4. Ergebnisse	27
4.1 Immunhistochemie	27
4.2 Histomorphometrie	29
4.3 Polychrome Sequenzmarkierung	33
4.4 Mikroradiographie	34
4.4.1 Deskriptive Beurteilung der Mikroradiographien	34
4.4.2 Ermittlung des Bone-Implant-Contact (BIC) und statistische Auswertung	35
4.4.2.1 Evaluierung der Mikroradiographien	35
4.4.2.2 Ergebnisse in der Übersicht	37
4.4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	41
5. Diskussion	43
5.1 Wahl des Tiermodells	44
5.2 Wahl der Beschichtungsmaterialien	44
5.3 Kritische Betrachtung der Ergebnisse	46
5.4 Schlussfolgerung	49
6. Literaturverzeichnis	50
Lebenslauf	63
Ehrenwörtliche Erklärung	64
Danksagung	66

III. Vorbemerkung

Die Planung, Vorbereitung und Durchführung der Studie erfolgten durch Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau während seines Beschäftigungsverhältnisses als Oberarzt an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg in dem Zeitraum 2003 bis 2005. Bei der Durchführung der Prozeduren an den Versuchstieren assistierte ihm Herr Prof. Dr. Dr. Karl Andreas Schlegel. Die Aufarbeitung der Prüfkörper sowie die Herstellung der auszuwertenden Präparate wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau von medizinisch-technischen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau im Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

Die Auswertung der Präparate sowie das Aufstellen und die Interpretation der Ergebnisse wurden mir, Dr. Michelle Klos, von Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau im Rahmen meiner zweiten Dissertation 2008 übertragen. An dieser Stelle bestätige ich bereits, dass die gesamte wissenschaftliche Analyse des Materials und das Verfassen der vorliegenden Dissertationsschrift von mir durchgeführt wurden.

IV. Zusammenfassung

Einleitung:

Die Beschichtung von Titanimplantaten mit angiogenetischen und osteoinduktiven Zytokinen könnte eine zeitlich schnellere Einheilung und ein größeres Bone-Implantat-Interface bedeuten. Dies könnte, insbesondere in Regionen verminderter Knochenqualität (z. B. infolge einer Radiotherapie) in einer größeren Primärstabilität und früheren Belastung resultieren. Daher war das Ziel der vorliegenden Studie, die Oberfläche dentaler Titanimplantate Kollagen-I-vermittelt mit rhBMP2 (recombinant human Bone Morphogenetic Protein), VEGF-A₁₆₅ (Vascular Endothelial Growth Factor) und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) sowie deren Kombinationen zu beschichten und in In-vivo-Experimenten am Tiermodell des Schweins qualitative und quantitative Unterschiede der knöchernen Einheilung der beschichteten Implantatoberfläche im Vergleich zu unbeschichteten Implantatoberflächen im zeitlichen Verlauf zu erfassen.

Material und Methode:

Es wurden 5 verschiedene Implantatbeschichtungen kreiert: 1. Kollagen (coll), 2. Kollagen + rhBMP2 (coll/BMP), 3. Kollagen + VEGF₁₆₅ (coll/VEGF), 4. Kollagen + bFGF (coll/FGF), 5. Kollagen + rhBMP2, VEGF₁₆₅ und bFGF (coll/combi). Als Kontrolle diente ein unbeschichtetes Titanimplantat. 18 Hausschweinen wurden insgesamt 180 Implantate inseriert. Postoperativ erfolgte eine polychrome Sequenzmarkierung. Nach der Opferung am 3., 5., 7., 14., 28. bzw. 56. postoperativen Tag und Evaluierung der entsprechenden Präparate wurde eine Bestimmung des Bone-Implantat-Interface (BIC) mittels Mikroradiographie durchgeführt. Die polychrome Sequenzmarkierung diente der Darstellung der dynamischen Umbauvorgänge im Knochen. Anhand der histomorphometrischen Präparate erfolgte eine histologische Beurteilung der Osseointegration. Das Ziel der immunhistochemischen Untersuchung war das Aufzeigen der Aktivitätsbereiche im Rahmen der Knochenneubildung durch den Nachweis von Kollagen I.

Ergebnisse:

Bei Betrachtung der BIC-Mittelwerte für die jeweiligen Beschichtungen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im zeitlichen Verlauf war für die Kontrolle, coll/VEGF₁₆₅, und coll/3er-combi ein kontinuierlicher Anstieg des BIC zu verzeichnen, während die anderen drei Beschichtungen im Verlauf sowohl eine Zunahme als auch

Abnahme des BIC zeigten. Interessanterweise wies coll/bFGF am 28. Tag post implantationem, auch wenn der Unterschied zu den anderen Beschichtungen nicht signifikant war ($p = 0,068$), prozentual mit Abstand das höchste BIC (74,0 %) auf. Bis zum 56. Tag nach der Implantation war dann aber eine Abnahme des BIC auf 60,3 % zu verzeichnen. Am 56. Tag post implantationem wurden die höchsten BIC für die Kontrolle (76,0 %), coll (75,0 %) und coll/3er-combi (75,0 %) ermittelt. Signifikanzen wurden nicht festgestellt ($p = 1, 0,593, 0,068, 0,068$ bzw. $0,068$).

Die Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung erbrachte ein vom ortständigen Knochen ausgehendes zentripetales Knochenwachstum.

Anhand der histomorphometrischen Präparate ließ sich sowohl bei den beschichteten Implantaten als auch bei den unbeschichteten Kontrollkörpern bereits am 3. Tag nach der Implantation vom Wirtsknochen ausgehend Osteoid nachweisen.

Die immunhistochemischen Präparate wurden aufgrund der sehr uneinheitlichen Färbeergebnisse nicht ausgewertet.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend ist zu resümieren, dass abgesehen von FGF am 28. Tag nach Implantatinserktion, keine der Beschichtungen gegenüber der unbeschichteten Kontrolle vorteilhaft scheint. Vor diesem Hintergrund ist, vorbehaltlich weiterer Studien, eine Beschichtung von dentalen Implantaten mit Zytokinen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix in Anbetracht des Aufwands und der Kosten, die damit verbunden sind, sowie auf Grund der Tatsache, dass die Erfolgsrate von Implantaten derzeit mit bis zu 95 % angegeben wird, kritisch zu betrachten. Dies gilt vor allem für Situationen, in denen eine ausreichend hohe Knochenqualität gegeben ist. Für bestrahlten Knochen und andere Knochen minderer Qualität dagegen sollte, insbesondere vor dem Hintergrund einer allgemein angestrebten zeitlich komprimierteren kaufunktionellen Rehabilitation von Patienten mit einem schlechten Knochenlager, in weiteren Studien der Nutzen solcher Beschichtungen validiert werden.

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen der dentalen Implantologie

Dentalimplantate sind bezüglich des Materials bzw. des Makro- und Mikrodesigns vielfältig gestaltete Körper, die in den Kieferknochen eingebracht werden und nach Einheilung als Verankerung für Kronen, Brückenkonstruktionen, Teil- oder Totalprothesen dienen. Sie stellen bei Patienten mit ausgeprägter Atrophie der Kiefer oder bei Patienten nach Tumoroperationen der Mundhöhle häufig die einzige Möglichkeit dar, einen Zahnersatz einzugliedern. In Analogie zu intraoralen Implantaten sind miniaturisierte Implantatsysteme in ähnlicher Form auch für extraoral entwickelt worden und haben sich in der Defektprothetik erfolgreich etabliert, da sie den Tragekomfort und auch die Ästhetik von Gesichtseprothesen wesentlich verbessern [1-5]. Schätzungsweise gibt es inzwischen über 2000 Implantattypen [6]. Es werden hohe Ansprüche an die modernen endossalen Implantate gestellt, wobei folgende allgemeine Anforderungen erfüllt sein müssen: Biokompatibilität, Oberflächenmikrostrukturierung, Osseointegration, angemessene Verweildauer unter Funktion, geringe Folgeschäden nach Implantatverlust, implantatkongruente Knochenbettpräparation, Vermeidung thermischer Knochenschäden, sterile Anlieferung der Implantate, Möglichkeit einer kontaminationsfreien Implantation, sinnvolle Aufbauteile, Präzisionspassungen, optimale Pflegemöglichkeiten, Nachlieferungen auch nach großen Zeiträumen.

Bei der Implantatversorgung unterscheidet man ein- und mehrzeitige Verfahren. Es werden drei Implantationszeitpunkte unterschieden. Erfolgt die Implantatinserterion erst nach Abschluss der Weichteil- als auch der Knochenheilung, spricht man von einer Spätimplantation. Demgegenüber steht die Methode der Sofortimplantation, bei der das Implantat direkt nach Zahnverlust gesetzt wird. Des Weiteren ist eine verzögerte Sofortimplantation möglich, bei der lediglich die Konsolidierung des Weichgewebes abgewartet wird [7, 8]. Für Dentalimplantate wurde früher eine Einheilperiode vor der Belastung von 3 – 4 Monaten empfohlen [9]. Mittlerweile konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, dass bei günstigen Voraussetzungen auch eine Sofortbelastung möglich ist [10-12].

Wie alle Implantate müssen Dentalimplantate sowohl einmalige Spitzenbelastungen unbeschadet überstehen können, als auch Millionen von Belastungszyklen auf nied-

rigerem Niveau standhalten. Neben dem Implantatmaterial, der makroskopischen Gestaltung und der Oberflächenmikrostrukturierung stellen auch die Knochendichte, die biomechanische Belastung und das chirurgische Vorgehen wichtige Faktoren dar, die die Osseointegration von Implantaten und damit deren Langzeiterfolg beeinflussen [9]. Seit der Beschreibung der Osseointegration [13, 14] und des Nachweises der klinischen Anwendbarkeit [15] kann mittlerweile auf eine 40-jährige Erfahrung mit enossalen dentalen Implantaten zurückgeblickt werden. Langzeit-Verlaufsstudien, die zum Teil einen Nachbeobachtungszeitraum von 15 Jahren nach Implantatinserktion umfassen, beschreiben langfristige Erfolgsraten von etwa 95 % [15-18].

1.2 Implantatmaterial

Titan ist heutzutage sowohl in der zahnärztlichen Chirurgie als auch in anderen Fachbereichen das Implantatmaterial der Wahl. Die Reinform des Metalls (commercially pure Titan, cpTi) aber auch dessen Legierungen zeichnen sich durch eine hohe Bruch- und Zugfestigkeit bei geringem Gewicht aus. Im zahnmedizinischen Bereich wird insbesondere cpTi angewendet, gegen das keine Hypersensivität bekannt ist [19] und für das in In-vivo-Studien eine bessere Knocheneinheilung beobachtet wurde [20, 21]. Obwohl Titan ein eher unedles Metall ist, das in einer Elektrolytlösung zur Freisetzung von Ionen neigt, weist es eine hohe Korrosionsfestigkeit auf, die der der besten Edelmetalllegierungen ebenbürtig ist. Dies ist auf die Ausbildung einer passivierenden Oxidschicht an der Oberfläche zurückzuführen [22]. Das cpTi gilt als bioinert, da dessen Verankerung im Knochen rein mechanischer Natur ist. Hierbei soll die Oxidschicht Einfluss auf die Zell-Implanat-Wechselwirkung und damit auf die Osseointegration haben [23].

Wesentlich seltener als Titan finden Vollkeramiken Anwendung in der dentalen Implantologie. Ein häufiger Vertreter ist hier die bioinerte Aluminiumoxidkeramik, für die eine hohe Druckfestigkeit und gute Einheilungseigenschaften beschrieben wurden [24]. Bei Ca-stabilisierten Oberflächen wurde Zirkon-IV-Oxid sogar als osteogenetisch aktiv beschrieben [25]. Aus werkstoffkundlicher Sicht sind bei den vollkeramischen Implantaten jedoch Einschränkungen zu machen, da sie mit den typischen Nachteilen, wie geringer Biegefestigkeit und Sprödigkeit, verbunden sind.

1.3 Makrodesign

Die Makrostruktur eines Implantates ist für die Stabilität und Formfüllung sowie die mechanische Verankerung und das Tragen der Aufbauten verantwortlich. Die Implantatformen sind inzwischen sehr vielfältig und reichen von konischen Implantaten, über Zylinder und Stufenzylinder bis zu Schrauben. Hinzu kommen noch Blattimplantate, die ihr Hauptanwendungsgebiet in der Behandlung von Patienten mit einem reduzierten Knochenangebot haben. Da die Knochenaugmentationsmethoden jedoch immer mehr an Bedeutung gewinnen, verliert sich diese Art der Implantation. Ein weiterer Unterschied besteht in der Gestaltung des Überganges vom eigentlichen Implantat zum Aufbau tragenden Abutment. Hierbei werden Innen- und Außen-sechskants bzw. -achtkants sowie Tube-in-Tube-Systeme angeboten.

1.4 Mikrodesign

Neben dem Makrodesign der Implantate sind im letzten Jahrzehnt die Implantatoberfläche und deren Modifikation in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt [26, 27]. Bereits vor 30 Jahren wurde postuliert, dass die ideale Implantatoberfläche zur Knochenverankerung rau sein sollte [28]. Aufgrund zahlreicher experimenteller Studien, die für Implantate mit rauem Mikrorelief im Vergleich zu glatt strukturierten Implantatoberflächen eine wesentlich bessere Verankerung im Knochen beschreiben, ist dies heute unbestritten. Der hierbei signifikant höhere Implantat-Knochen-Kontakt wird auf den fördernden Einfluss der Mikrotopographie auf die Osteoblastenproliferation und -differenzierung zurückgeführt [29-32]. Bei der Aufrauung von Oberflächen unterscheidet man additive und ablativ Verfahren. Die gängigsten Methoden sind das Plasma-Spray-Verfahren respektive das Abstrahlen mit Partikeln in Kombination mit Säureätzung.

1.5 Implantatbeschichtungsverfahren

1.5.1 Konventionelle Methoden zur Implantatbeschichtung

Ein weiteres Verfahren zur Verbesserung der Implantateinheilung und Vergrößerung des Knochen-Implantat-Kontaktes (bone implant contact, BIC) stellt das Aufbringen von Beschichtungen dar, wie z. B. mit Fluor, Hydroxylapatit, ANOF, (HIP-) Glaskeramik und TPS [33-40]. Auch hier konnte eine Verbesserung der biomechanischen und histomorphometrischen Eigenschaften nachgewiesen werden. Allerdings konnte mehrfach eine Instabilität bzgl. des Verbundes Metalloberfläche-Beschichtung und innerhalb der Beschichtung selbst aufgezeigt werden. So wurden Oberflächenabrasion bei HIP-Glaskeramik, Abrasion und Resorption bei Hydroxylapatit, als auch Frakturen, Mikroporen und partikulärer Zerfall der Beschichtungen von Fluor-/Hydroxylapatit, TPS, ANOF und HIP-Glaskeramik gefunden [41-43]. Dadurch ergeben diese Materialien keine dauerhaften und undurchdringlichen Oberflächenbeschichtungen; die Frakturen sind in der Schicht, als auch im Bereich zwischen Beschichtung und Metall – diese Stelle erwies sich in zahlreichen Untersuchungen als die statisch am geringsten belastbare – möglich. Ebenso sind die beschriebenen Nachteile einer Metallpartikel- oder Ionenfreisetzung nicht ausgeschaltet.

1.5.2 Implantatbeschichtungen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix und Zytokinen

Eine innovative Möglichkeit bietet das Aufbringen einer mit Zytokinen beladenen Kollagenschicht, die die knöcherne Einheilung an der Implantatoberfläche beschleunigen soll.

Kollagen, das mit über 90 % die Hauptkomponente der organischen extrazellulären Matrix darstellt, repräsentiert hierbei die natürliche Umgebung des Implantates. Im Vergleich zu sandgestrahlten Titanimplantaten konnte für kollagenbeschichtete Implantate ein höherer BIC gezeigt werden [44-46]. Obwohl die Mechanismen der Einflussnahme von Kollagenbeschichtungen auf die Osseointegration nur teilweise entschlüsselt sind [47, 48], scheint der direkte Einfluss auf Zellgewebe-Wechselwirkungen, welche einen aktiven Prozess der Knochenbildung induzieren, entscheidend [49, 50].

Zytokine sind Proteine, die eine mitogene (zellteilungsaktivierende) und/oder morphogene (zelldifferenzierende) Wirkung haben. Nach Implantation wird das zunächst entstehende periimplantäre Koagulum durch einwachsende Angioblasten aufgeschlossen, Makrophagen und Osteoklasten bauen Knochentrümmer ab und aus dem eröffneten Markraum treten osseostimulative Zytokine und Präosteoblasten aus und bilden neuen Knochen, der formschlüssig an das Implantat heranwächst [51]. Wesentliche Bedeutung hierbei haben die Zytokine PDGF (Platelet Derived Growth Factor), IGF (Insulinlike Growth Factor), FGF (Fibroblaste Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), die Isoformen des TGF β (Transforming Growth Factor) und BMPs (Bone Morphogenic Proteins) [52-55]. Es sind bioaktive Moleküle, die mitogen sind (VEGF, FGF2, TGF β 2 u. a.) oder die Aktivität von Osteoblasten erhöhen (TGF β 1) bzw. osseokonduktive Wirkung haben (BMP's) [51, 56]. Diese induzieren die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoprogenitorzellen, die weiter zu Präosteoblasten und reifen Osteoblasten differenzieren (Abb. 1).

Die Beschichtung von Titanimplantaten mit angiogenetischen und osteoinduktiven Zytokinen könnte eine zeitlich schnellere Einheilung und einen größeren BIC bedeuten. Dies könnte, insbesondere in Regionen verminderter Knochenqualität (z. B. infolge einer Radiotherapie), in einer größeren Primärstabilität und früheren Belastung resultieren. Daher war das Ziel der vorliegenden Studie, die Titanoberfläche dentaler Implantate Kollagen-I-vermittelt mit bFGF, VEGF-A₁₆₅ und rhBMP2 sowie deren Kombinationen zu beschichten und in In-vivo-Experimenten am Tiermodell des Schweins qualitative und quantitative Unterschiede der knöchernen Einheilung der beschichteten Implantatoberflächen im Vergleich zu unbeschichteten Implantatoberflächen im zeitlichen Verlauf zu erfassen.

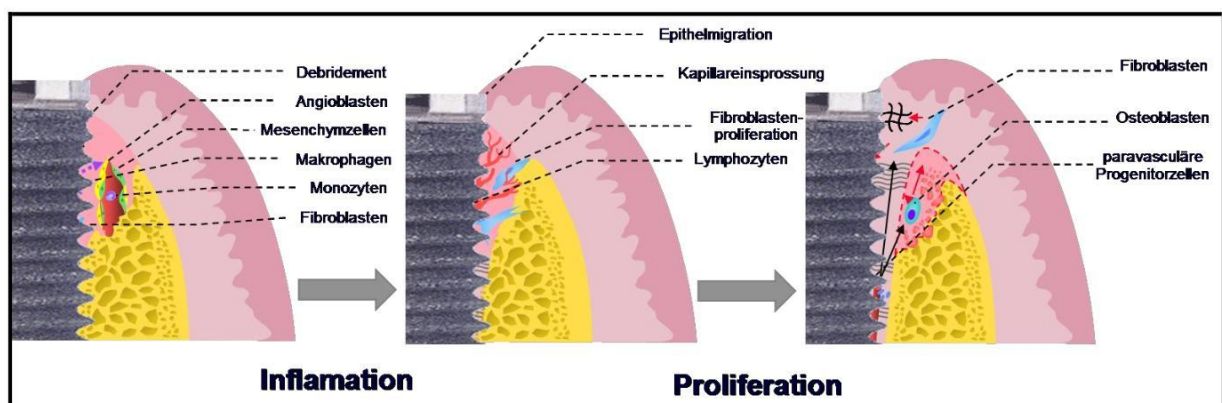


Abb. 1: Abläufe bei der Implantateinheilung

(Abb. wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau)

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung der folgenden Fragestellungen:

1. Welche qualitativen Unterschiede bestehen bei der knöchernen Einheilung von Implantatoberflächen, die mit den Zytokinen bFGF, VEGF-A₁₆₅ und rhBMP2 beschichtet wurden, im Vergleich zu unbeschichteten Implantatoberflächen im zeitlichen Verlauf?
2. Welche quantitativen Unterschiede zeigt der Knochen-Implantat-Kontakt (bone implant contact, BIC) von Implantatoberflächen, die mit den Zytokinen bFGF, VEGF-A₁₆₅ und rhBMP2 beschichtet wurden, im Vergleich zu unbeschichteten Implantatoberflächen im zeitlichen Verlauf?
3. Ist hinsichtlich der Qualität und Quantität des BIC die Beschichtung von Implantatoberflächen mit einer Kombination von bFGF, VEGF-A₁₆₅ und rhBMP2 im Vergleich zur Beschichtung mit nur einem dieser Zytokine vorteilhaft?

Diese Ergebnisse sollen Aussagen zu der Frage einer schnelleren knöchernen Einheilung im Hinblick auf eine frühere Belastungsmöglichkeit Zytokin-beschichteter Implantate erlauben.

Die Erlaubnis zur Durchführung der Studie wurde bei der Bezirksregierung Mittelfranken, Ansbach, Deutschland beantragt und durch diese genehmigt (Tierversuchs-Nr. 521-2521.31-06/02).

3. Material und Methoden

3.1 Implantat

Bei den verwendeten Implantaten (Abb. 2) handelte es sich um BEGO-Semados®-Vollschraubenimplantate aus Reintitan mit mikrostrukturierter Oberfläche (BEGO-Semados GmbH & Co. KG, Bremen, Germany). Die Implantatlängen betrugen 11 mm, die Durchmesser 3,75 mm.



Abb. 2: BEGO-Semados®-Vollschraubenimplantat

3.2 Tiermodell

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 18 weiblichen Hausschweinen (Fa. Cotswold Deutschland, Sauerstr.7, 32657 Lemgo) durchgeführt. Das Schwein gilt als sehr verlässliches Modell in Bezug auf Aussagekraft, Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit der Befunde auf humane Verhältnisse. Die anatomischen und biochemischen bzw. physiologischen Gegebenheiten des gewählten Versuchstieres bilden hierbei die Voraussetzung zur Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen. Der Schweineschädel ist in Struktur und Bezaehlung dem des Menschen ähnlich. Das Os frontale als desmaler Knochen eignet sich dabei besonders als Versuchsmodell. Zudem sind beim Schwein Gewebedurchblutung, zirkulatorische Vorgänge und Frakturheilung mit den Verhältnissen beim Menschen vergleichbar [57-63]. Dadurch eignet sich das gewählte Versuchstier als Großtier, ebenso wie das Schaf und der Hund, für die experimentelle Knochen- und Transplantationschirurgie, zumal die Knochenneubildungsraten des adulten

Schweins, im Vergleich zum Hund, fast mit denen des Menschen übereinstimmen (Schwein: 1,2-1,5 $\mu\text{m}/\text{die}$; Hund: 1,5-2,0 $\mu\text{m}/\text{die}$; Mensch: 1,0-1,5 $\mu\text{m}/\text{die}$) [57-63]. Beim Schaf liegen diese Werte ca. 2- bis 2,5-fach über denen des Menschen. Daher eignen sich Hausschweine für Studien der Knochenheilung bzw. des Knochenumbaus besonders als Versuchsmodell, da die Stoffwechselraten und damit die ossären Heilungszeiten etwa denen des Menschen entsprechen.

Ein standardisiertes Vorgehen im Rahmen der Operationen sowie bei der Aufarbeitung des gewonnen und des ortsständigen Knochens mit Hilfe dieses etablierten Tiermodells bewirkt die größtmögliche Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchgruppen.

3.3 Implantatbeschichtungen

3.3.1 bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)

(R&D Systems, Wiesbaden, Germany)

Die ersten FGFs wurden in den 1970-iger Jahren entdeckt [64]. Anfangs nahm man an, dass sie ausschließlich auf Fibroblasten wirken, was ihnen auch ihren Namen gab. Heute ist bekannt, dass FGFs ein weites Spektrum zellulärer Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration in fast allen Zellen, insbesondere von Endothelzellen, regulieren. Es existieren sogar Subtypen, die keine Wirkung auf Fibroblasten haben. Bislang sind 23 verschiedene Subtypen der FGF-Familie beschrieben: FGF-1 bis FGF-23, wobei FGF-1 (acidic-FGF) und FGF-2 (basic-FGF) die aktivsten Wachstumsfaktoren der FGF-Familie darstellen. Im adulten Organismus sind sie aktiv eingebunden in die Vorgänge der Wundheilung, der Angiogenese sowie in die Regeneration von Nerven- und Knorpelgewebe. Hierbei bewirken insbesondere Hypoxie und Ischämie eine Up-Regulation von FGFs [65-67].

FGF-1 und FGF-2 wurden erstmalig aus dem Gehirn von Rindern gewonnen und isoliert [68], später wurden auch die Strukturen des humanen FGF-1 und FGF-2 beschrieben [69].

3.3.2 VEGF-A₁₆₅ (Vascular Endothelial Growth Factor)

(R&D Systems, Wiesbaden, Germany)

VEGF wurde erstmals 1989 beschrieben [70]. Dieses Zytokin weist eine entscheidende Funktion in der Embryonalentwicklung sowie bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen der Angiogenese auf [71-73]. Die Angiogenese ist wiederum ein essentieller Bestandteil der Knochenheilung [74]. VEGF stimuliert hauptsächlich vaskuläres Endothel, hat aber auch Einfluss auf andere Zellen. So aktiviert es z. B. die Migration von Monozyten und Makrophagen [75]. Die VEGF-Expression wird durch Zellhypoxie reguliert.

Es sind 6 verschiedene Formen des VEGF bekannt: A – F, wobei VEGF-E die viralen Homologen und VEGF-F die Homologen im Schlangengift darstellen [76]. VEGF-A wird beim Erwachsenen in fast allen vaskulären Geweben gefunden. Das für VEGF-A kodierende Gen kann durch alternierendes Splicing verschiedene Varianten des Proteins hervorbringen. So wurden bisher die Isoformen VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₃₈, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A_{165b}, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆ beschrieben, wobei die Nummern der Aminosäureanzahl entsprechen. VEGF-A₁₂₁ und VEGF-A₁₆₅ sind frei im Plasma gelöste Formen. VEGF ist ein hochspezifisches Mitogen für Gefäßendothelzellen. In vitro stimulieren die Isoformen VEGF-A₁₂₁ und VEGF-A₁₆₅ die Vermehrung von Endothelzellen großer Gefäße. In vivo spielen sie eine wichtige Rolle in der Neubildung von Gefäßen, wobei hier ein starker Synergismus zwischen der Wirkung von FGF und VEGF besteht. Es wurde ein Einfluss von VEGF auf die interstitielle Kollagenase beschrieben, welche interstitielles Kollagen I – III auflöst.

3.3.3 rhBMP2 (recombinant human Bone Morphogenetic Protein)

(R&D Systems, Wiesbaden, Germany)

Die BMPs gehören der TGF β -Superfamilie an, die eine Gruppe von Mediatoren repräsentiert, welche eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen spielen [77]. Neben ihrer knocheninduzierenden Fähigkeit bei Vertebraten, die dem BMP seinen Namen gab [78], vermögen sie die Knorpelbildung zu induzieren und

Mesenchymzellen zu differenzieren [79]. BMPs kommen in großen Mengen in der Knochenmatrix vor, konnten aber auch in vielen anderen Organen in signifikanten Mengen nachgewiesen werden, wobei ihre biologische Wirkung in diesen Geweben bislang ungeklärt ist [80]. Von den 16 bisher charakterisierten BMPs [81] besitzt BMP2 die größte osteoinduktive Potenz [82-84].

Urist gelang es 1982 die BMPs aus der Knochenmatrix zu isolieren [85]. Der Aufwand war jedoch beträchtlich; so waren bis zu 300.000 Reinigungsvorgänge nötig, um ein einzelnes Proteinmolekül zu erhalten. Auf diese Weise konnte aus 1 kg Knochen nur 0,1 µg BMP gewonnen werden. Erst mit der Entschlüsselung der entsprechenden Gensequenzen wurde eine rekombinante Herstellung von BMP möglich [86]. Wang synthetisierte als erster aktives rhBMP2 aus Hamsteroarialzellen [87]. 1996 gelang die Expressierung von rhBMP2 in *E. coli* [88]. Einige Jahre später gelang es in einem ähnlichen System rhBMP2 in signifikanten Mengen zu synthetisieren, so dass heute ausreichende Mengen für Forschungszwecke verfügbar sind. Die osteoinduktive Potenz des natürlichen BMP2 übertrifft nur in geringem Maße die des rekombinanten Proteins [89].

3.3.4 Implantatbeschichtung

Es wurden 5 verschiedene Implantatbeschichtungen kreiert, wobei bei der einen Hälfte der zytokinbeschichteten Implantate 1 µg der jeweiligen Zytokine und bei der anderen Hälfte der zytokinbeschichteten Implantate 10 µg der jeweiligen Zytokine aufgebracht wurden:

1. Kollagen (coll)
2. Kollagen + 1 µg bzw. 10 µg bFGF (coll/bFGF)
3. Kollagen + 1 µg bzw. 10 µg VEGF₁₆₅ (coll/VEGF₁₆₅)
4. Kollagen + 1 µg bzw. 10 µg rhBMP2 (coll/rhBMP2)
5. Kollagen + je 1 µg bzw. je 10 µg bFGF, VEGF₁₆₅ und rhBMP2 (coll/3er-combi)

Die Zytokinbeschichtungen erfolgten Kollagen-I-vermittelt mittels Biodot-Methode (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ludwig-Maximilians-

Universität München, Deutschland). Dies ist ein Sprühverfahren, bei dem in einem Mikrotropfendispensier-Roboter (BioJet Quanti™ 3000, BioDot Ltd., Huntingdon, Großbritannien) ein feiner Nebel aus Tröpfchen der jeweiligen Rezeptur auf die zu beschichtende Oberfläche abgeschieden und anschließend einer Vakuumtrocknung (VTS-2, Memmert, Schwabach, Germany) unterzogen wird (Abb. 3).

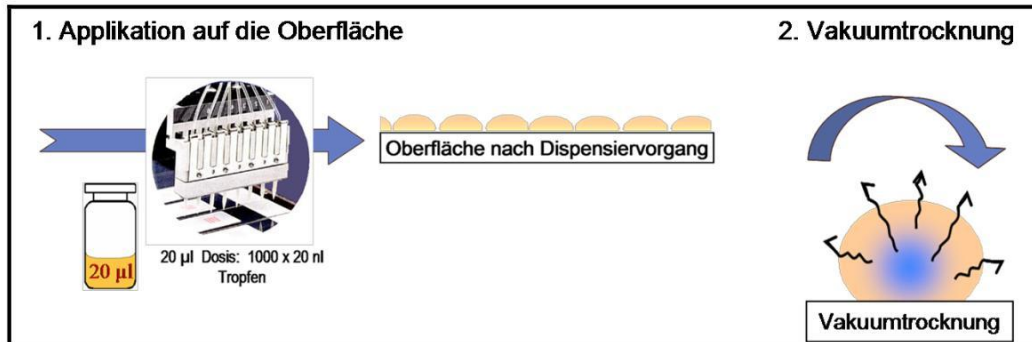


Abb. 3: Oberflächenbeschichtung mittels Mikrotropfendispensierroboter

Für die vorliegende Studie erfolgte in einem ersten Schritt zunächst die Kollagenbeschichtung der Implantate, um anschließend die jeweiligen Zytokine in den oben angegebenen Volumina in die Oberfläche zu absorbieren (Abb. 4). Als Kontrolle dienten unbeschichtete Implantate.

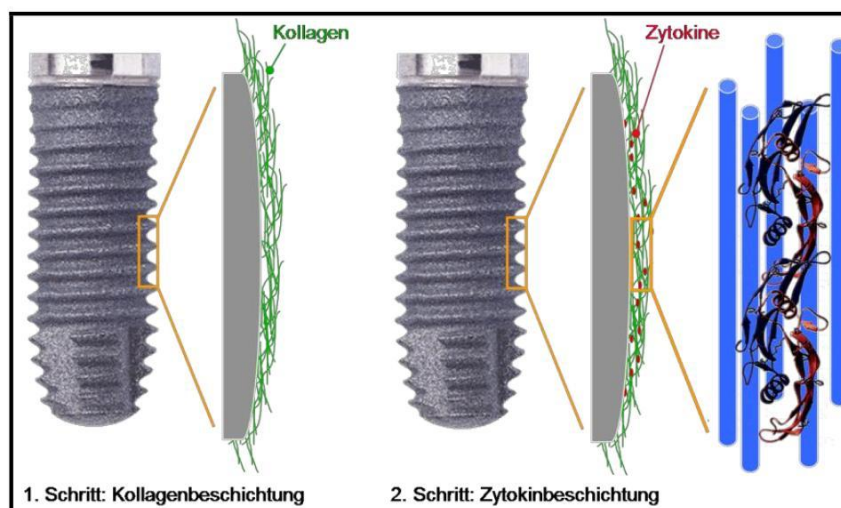


Abb. 4: Schematische Darstellung der Implantatbeschichtung

(Abb. wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau)

3.4 Versuchsgruppen

Es wurden 10 Versuchsgruppen gebildet, die zu 6 Zeitpunkten nachuntersucht wurden. Hierbei standen pro Untersuchungszeitpunkt 3 Tiere zur Verfügung, die jeweils 10 Implantate erhalten hatten.

Hieraus ergaben sich folgende Gruppenbildungen:

1. Implantat ohne Beschichtung	1
2. Implantat mit Kollagen	1
3. Implantat mit Kollagen + 1 µg bFGF	1
4. Implantat mit Kollagen + 10 µg bFGF	1
5. Implantat mit Kollagen + 1 µg VEGF ₁₆₅	1
6. Implantat mit Kollagen + 10 µg VEGF ₁₆₅	1
7. Implantat mit Kollagen + 1 µg rhBMP2	1
8. Implantat mit Kollagen + 10 µg rhBMP2	1
9. Implantat mit Kollagen + 1 µg bFGF + 1 µg VEGF ₁₆₅ + 1 µg rhBMP2	1
10. Implantat mit Kollagen + 10 µg bFGF + 10 µg VEGF ₁₆₅ + 10 µg rhBMP2	1

Gesamt: 10 verschiedene Implantatoberflächen = 10 Implantate pro Tier (Abb. 5)

Bei 3 Tieren pro Zeitpunkt und 6 Zeitpunkten resultierten 18 untersuchte Schweine. Pro Gruppe wurden nach randomisiertem Auswahlverfahren die oben dargestellten Materialkombinationen eingesetzt. Dies bedeutet, dass pro Schwein 10 Defekte gesetzt wurden (Abb. 5). Somit wurde jede Materialkombination in 18 Tieren verwendet.

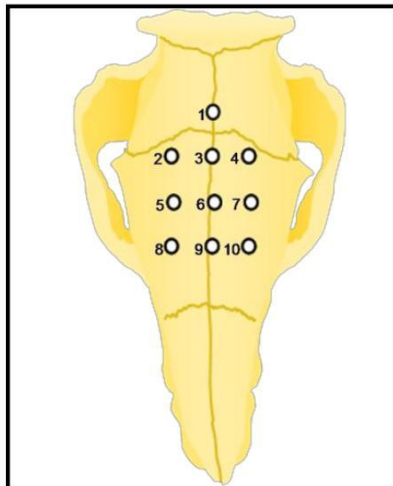


Abb. 5: Implantatpositionen

1. Implantat ohne Beschichtung
2. Implantat mit Kollagen
3. Implantat mit Kollagen + 1 µg rhBMP2
4. Implantat mit Kollagen + 10 µg rhBMP2
5. Implantat mit Kollagen + 1 µg VEGF₁₆₅
6. Implantat mit Kollagen + 10 µg VEGF₁₆₅
7. Implantat mit Kollagen + 1 µg bFGF
8. Implantat mit Kollagen + 10 µg bFGF
9. Implantat mit Kollagen + 1 µg bFGF + 1 µg VEGF₁₆₅ + 1 µg rhBMP2
10. Implantat mit Kollagen + 10 µg bFGF + 10 µg VEGF₁₆₅ + 10 µg rhBMP2

Je 3 Tiere wurden nach 3, 5, 7, 14, 28 und 56 Tagen Einheilungszeit (nachfolgend auch als xy-Tagesgruppe bezeichnet) geopfert und untersucht (Abb. 6). Damit standen pro Tötungszeitpunkt und Materialkombination 3 Proben zur Verfügung.

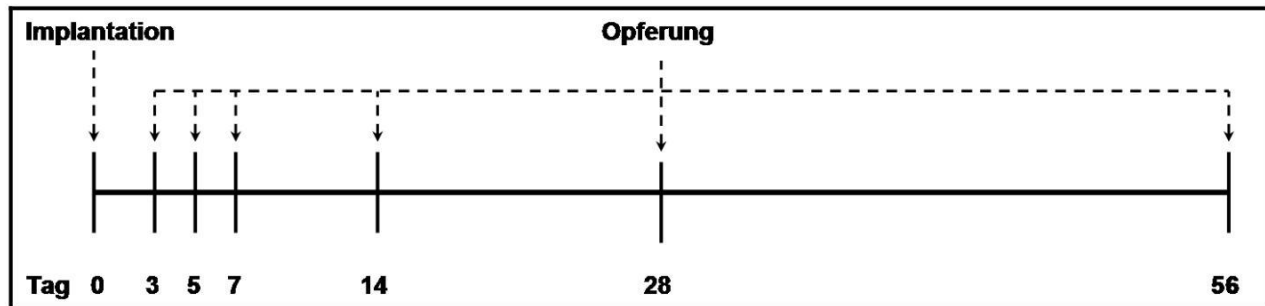


Abb. 6: Schematische Darstellung der Untersuchungszeitpunkte

3.5 Chirurgisches Vorgehen und postoperativer Ablauf

Alle Eingriffe erfolgten, wie nachfolgend dargestellt, in Intubationsnarkose (ITN):

1. Präoperative Vorbereitung:

Die Tiere blieben 12 Stunden vor dem Eingriff nüchtern.

2. Prämedikation:

Die Tiere erhielten Atropinsulfat (0,05 mg/kg), um die Speichelbildung zu reduzieren und die Herzaktion zu stimulieren sowie Azaperon zur Sedierung.

3. Einleitung der Narkose:

Die Tiere erhielten eine i.m.-Injektion in die Nackenregion mit Midazolam (1 mg/kg) (Dormicum®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und Ketamin (10mg/kg) (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland). Anschließend erfolgte die Einleitung der Narkose mit 30 mg Propofol (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)

4. Endotracheale Intubation:

Es wurden ein Laryngoskop mit einem 20 cm langen, geraden Spatel und ein Tubus Größe 5 verwendet. Nach erfolgreicher Intubation erfolgt die Beatmung zunächst mit dem Ambubeutel.

5. Inhalationsnarkose:

Die Anästhesie wurde durch ein Gemisch von Isofluran (ca. 1,5 %) (Baxter, Heidelberg, Deutschland) und O₂ unterhalten. Es erfolgte eine gewichtsbezogene Beatmung mit ca. 3 – 5 l/min.

6. Ausleiten der Narkose:

Beenden der Gabe von Inhalationsnarkotika und weiteres Beatmen des Tieres über den Tubus bis zum Erwachen des Tieres und Einstellen der Spontanatmung. Extubation.

Nach Einleitung der Narkose erfolgte die Insertion der Implantate, wie nachfolgend dargestellt:

1. Rasur, Desinfektion und Abdecken des Operationsgebietes sowie Infiltrationsanästhesie des Operationsgebietes (Ultracain-DS forte®, Sanofi Aventis, Frankfurt a. M., Deutschland)
2. Inzision der Kopfschwarte bis auf den Knochen im medianen Bereich der regio frontale sowie subperiostale Freipräparation des Knochens
3. Markierungen der Implantatpositionen, setzen der Pilotbohrungen und sukzessives Aufarbeiten der Implantatstollen auf einen Durchmesser von 3,75 mm (Abb. 7A). Dann Einbringen der Implantate unter Wasserkühlung (Abb. 7B + C), Entfernen der Einbringpfosten und Aufsetzen der Abdeckkappen (Abb. 7D)
4. Rückverlagerung des Weichgewebes und primärer Wundverschluss mit resorbierbaren Vicrylnähten (Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt, Deutschland).

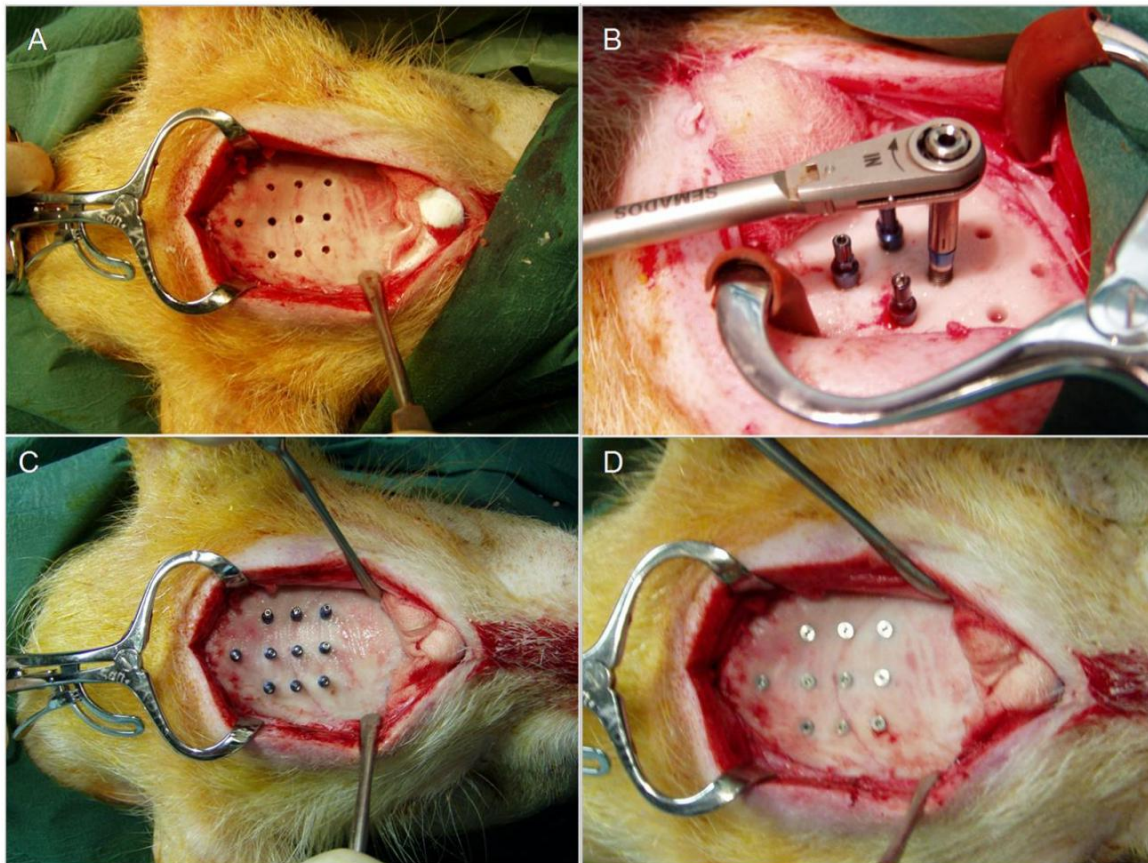


Abb. 7:

A) aufbereitete Implantatstollen; B, C) Einbringen der Implantate; D) eingebrachte Abdeckschrauben

Die Tiere erhielten eine perioperative Antibiose (Tardomycel Comp III, Bayer, Leverkusen, Deutschland) zur Verringerung von Infektionsrisiken.

3.6 Polychrome Sequenzmarkierung (Injektion)

Die polychrome Sequenzmarkierung ist ein Verfahren mit dem sich die dynamischen Umbauvorgänge im Knochen darstellen lassen. Im Gegensatz zu den radiologischen Verfahren, die immer nur eine Momentaufnahme wiedergeben, ermöglicht die polychrome Sequenzmarkierung Ort, Zeitpunkt und Umfang von knöchernen Umbauprozessen histologisch sichtbar zu machen. Dies wird durch die Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen, die sich farblich unterscheiden und zu bestimmten Zeitpunkten als Bolus appliziert werden, erreicht. Die Farbstoffe bilden Chelatkomplexe und lagern sich in die Mineralisationsfront des Knochens in großen Konzentrationen ein, indem sie durch Bindung an Kalziumsalze in die Apatitstruktur des sich neubildenden Knochens eingebaut werden [90-93]. 1958 wurde erstmalig beschrieben, dass sich Tetrazyklin im lebenden Knochen ablagert und bei mikroskopischer Betrachtung eines Hartschliffes unter ultraviolettem Licht eine gelbe Farbbande an Stellen der Knochenneubildung sichtbar wird [94]. Mit dem sich orange darstellenden Xylenorange, dem roten Alizarinkomplex sowie dem als leuchtend grüne bzw. blaue Bande sichtbaren Calceingrün bzw. Calceinblau wurden weitere Fluoreszenzfarbstoffe entdeckt, die in der polychromen Sequenzmarkierung Verwendung finden [91-93].

Durch die unterschiedlich gefärbten Banden ist eine Differenzierung der jeweiligen neu gebildeten Knochenabschnitte möglich und man kann somit Rückschlüsse auf die Dynamik der Knochenneubildung ziehen.

Zur Bestimmung der Wachstumsrichtung des neu gebildeten Knochens, und um einen Anhaltspunkt über die zeitliche Abfolge der Knochenumbauvorgänge an der Implantatoberfläche zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Studie postoperativ folgende Medikamente nach Sedierung des Tieres mit Azaperone (4mg/kg KG) und Midazolam (1mg/kg KG) langsam i. v. in die Vena auricularis lateralis appliziert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Tagesgruppe, Farbstoff, Dosierung und Applikationszeitpunkt.

Tabelle 1: Polychrome Sequenzmarkierung

Gruppe Marker	3-Tages-Gruppe	5-Tages-Gruppe	7-Tages-Gruppe	14-Tages-Gruppe	28-Tages-Gruppe	56-Tages-Gruppe
Rolitetracyclin (gelb) (12 mg/kg KG)	/	3. postop. Tag	3. postop. Tag	3. postop. Tag	3. postop. Tag	6. postop. Tag
Alizarin (rot) (30 mg/kg KG)	/	/	5. postop. Tag	6. postop. Tag	6. postop. Tag	13. postop. Tag
Calceinblau (blau) (30 mg/kg KG)	/	/	/	10. postop. Tag	13. postop. Tag	30. postop. Tag
Calceingrün (grün) (20 mg/kg KG)	/	/	/	/	20. postop. Tag	41. postop. Tag

3.7 Opferung der Tiere

Nach Erreichen der geplanten Einheilzeit der Implantate erfolgte die Tötung der Tiere zur Materialgewinnung. Die Tiere erhielten zur Sedierung eine i. m.-Injektion in die Nackenregion mit Azaperone (1 mg/kg) und Midazolam (1 mg/kg) (Abbott GmbH, Max Planck Ring 2, 65205 Wiesbaden, Deutschland).

Zur intravitalen Gefäßdarstellung wurde R-B-Bariumsulfat in die Arteria carotis externa injiziert. Danach erfolgte die Tötung durch eine intravasale Injektion von 20%-iger Pentobarbitallösung (Abbott GmbH, Max Planck Ring 2, 65205 Wiesbaden, Deutschland) in die Ohrvene bis zum Herzstillstand.

3.8 Entnahme und Aufarbeitung der Prüfkörper

Nach Opferung der Tiere wurden die mit Implantaten versehenen Schädelkalottenbereiche en-bloc reseziert. Anschließend erfolgten die Fixierung mit Formaldehyd, Dehydrierung mit Ethanol und Einbettung in Methylnmethacrylat (Technovit 9100, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland).

Die Fixierung der Proben erfolgte über 14 Tage in einer gepufferten 4%-igen Formaldehydlösung (pH = 7,4) bei 4° C (Tab. 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung der 4%-igen Formaldehydlösung

100 ml	37%-iges Formaldehyd
4 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
6,5 g	Na ₂ HPO ₄
1000 ml	Aqua Dest (pH = 7,0)

Die Dehydrierung der Präparate erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Bei mehrfacher Erneuerung des Ethanols wurden die Präparate 2 – 6 Tage in der jeweiligen Alkoholkonzentration belassen (Tab. 3). Im Anschluss wurden sie für einen Tag in Xylol eingelegt.

Tabelle 3: Aufsteigende Alkoholreihe

1. – 2. Tag:	70%-iges Ethanol
3. – 4. Tag:	80%-iges Ethanol
5. – 8. Tag:	96%-iges Ethanol
9. – 14. Tag:	100%-iges Ethanol

Nach der Dehydrierung wurden die Proben für das Trenn-Dünnschliff-Verfahren vorbereitet. Dazu wurden sie in Technovit 9100 eingebettet. Das Einbettmedium setzte sich zusammen aus dem Kunststoff Methylmetacrylat, dem Weichmacher Dibutylphthalat und Benzoylperoxid als Katalysator für die Polymerisationsreaktion.

Zunächst erfolgte die zweimalige Infiltration der Proben. Hierzu wurde das Technovit 9100 mit dem Weichmacher versetzt und die Proben wurden für je fünf Tage in der Lösung belassen (Tab. 4).

Tabelle 4: Infiltration mit Technovit 9100

Zusammensetzung:	Technovit 9100 Dibutylphthalat (10 ml auf 100 ml MMA)
Infiltrationsdauer:	2 x 5 Tage
Infiltrationsbedingungen:	Raumtemperatur

Zur Einleitung der Polymerisationsreaktion wurde nach der Infiltration der Katalysator Benzoylperoxid zugegeben. Zur Vermeidung einer überschießenden Polymerbildung wurden die Proben in einem Wasserbad bei 22 °C ausgehärtet und anschließend bei 37 °C getempert (Tab. 5).

Tabelle 5: Polymerisationsvorgang

<u>Einbettlösung A</u>	
Zusammensetzung:	Technovit 9100 Weichmacher (10 ml auf 100 ml MMA) Benzoylperoxid (1g auf 100 ml MMA)
Einbetttdauer:	3 Tage
Einbettbedingungen:	22 °C
<u>Einbettlösung B</u>	
Zusammensetzung:	Technovit 9100® Weichmacher (10 ml auf 100 ml MMA) Benzoylperoxid (3g auf 100 ml MMA)
Einbetttdauer:	3 Tage
Einbettbedingungen:	22 °C

Nach Kennzeichnung wurden die Defekte zunächst singulär gesägt und dann mit Hilfe der Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath (Exakt Gerätebau, Norderstedt, Deutschland) Schnitte in einer Stärke von ca. 100 µm für die mikroradiographische Untersuchung bzw. für die Proben von den am 56. postoperativen Tag geopfertem Tiere anschließend Schnitte in einer Stärke von ca. 30 µm für die Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung hergestellt. Von einigen Implantaten wurden jeweils ein ca. 30 µm dickes

Präparat der histomorphometrischen Untersuchung und der immunhistochemischen Auswertung zugeführt.

Das auf dem Prinzip einer Bandsäge arbeitende Trennschleifsystem besteht aus Trenneinheit, Präzisionsparallelführung, dosierbarem Vorschub und einem Kühlsystem. Bei dem Sägevorgang pendelt die Werkstückführung um ihre eigene Achse, wodurch bei relativ hohen Schnittgeschwindigkeiten saubere Schnittflächen erzielt werden. Der Präparatevorschub wird über Gewichte gesteuert. Diese können in Abhängigkeit vom zu verarbeitenden Material eingestellt werden, um z. B. ein Ausbrechen von Knochenbälkchen zu verhindern.

3.9 Polychrome Sequenzmarkierung (Auswertung)

Zur Darstellung und Auswertung der Aktivitätsbereiche des Knochens zu den unterschiedlichen Markierungszeiten wurden die 30 µm dicken Präparate in der Fluoreszenzmikroskopie mit UV-Licht angeregt dargestellt, fotografiert und die Bilddaten elektronisch gespeichert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Axioscope Mikroskop (Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland), welches mit einer Fluoreszenzlampe (HBO 50, Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und einer digitalen Farbkamera (CC-12, Fa. Soft Imaging System, Münster, Deutschland) ausgestattet war.

3.10 Histomorphometrie

Zur Differenzierung unverkalkter Knochenmatrix gegenüber der mineralisierten Knochensubstanz erfolgte eine Masson-Trichrom-Goldner-Färbung von 30 µm dicken Schliffen. Durch ein Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die histologischen Schnitte fotodokumentiert und anschließend eingescannt.

3.10.1 Herstellung der Stammlösungen für die Masson-Trichrom-Goldner-Färbung

a) Weigerts Eisenhämatoxylin:

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden die gebrauchsfertige Weigerts Lösung A (alkoholische Hämatoxylin-Lösung) und Weigerts Lösung B (salzsaure Eisen(III)-Nitrat-Lösung) im Verhältnis 1:1 gemischt (Merck, Darmstadt).

b) Masson-Lösung:

Tabelle 6: Ansätze für die Lösungen A, B und C für die Masson-Lösung

<u>Lösung</u>	<u>Substanzen</u>
A	1 g Säurefuchsin + 1 ml Essigsäure + 100 ml aqua dest.
B	1 g Xylidin-Ponceau + 1 ml Essigsäure + 100 ml aqua dest.
C	0,5 g Azophloxin + 0,2 ml Essigsäure + 100 ml aqua dest.

Für 1000 ml Masson-Lösung wurden zunächst 33ml der Lösung A mit 66 ml der Lösung B gemischt. Anschließend wurden 100 ml der Lösung AB mit 20 ml der Lösung C und 880 ml 0,2%-iger Essigsäure vermischt (Tab. 6).

c) Orange-G:

10 g Orange-G wurden in 500ml aqua dest. gelöst. In diese Mischung wurden 15 g Molybdätophosphorsäure gegeben. Die angesetzte Lösung wurde unmittelbar vor dem Färben filtriert.

d) Lichtgrün:

0,5 g Lichtgrün und 1 ml Essigsäure wurden in 500 ml aqua dest. gelöst.

Die vorbereiteten Schnitte wurden nach folgendem Verfahren gefärbt (Tab. 7):

Tabelle 7: Färbevorgang

1.	20 min. Infiltration in Weigerts Eisenhämatoxylin
2.	5 min. Spülen in Leitungswasser
3.	7 min. Infiltration in Masson-Lösung
4.	Spülen in 2%-iger Essigsäure
5.	5 min. Infiltration in Orange-G
6.	Spülen in 2%-iger Essigsäure
7.	Spülen in aqua dest.
8.	Trocknen, Eindecken mit Technovit 7200 VLC
9.	10 min. Härten unter der Exakt-Polymerisationspresse

Bei dieser Methode wurden die verschiedenen Gewebestrukturen wie folgt angefärbt (Tab. 8):

Tabelle 8: Farbliche Darstellung der Gewebestrukturen

<u>Struktur</u>	<u>Farbe</u>
Osteoid , Bindegewebe	rot-orange
Zellkerne	blau-schwarz
Knochen, Kollagen	grün-türkis
Erythrozyten	orange

3.11 Immunhistochemie

Der bindegewebige Hauptteil von Knochen und Knorpel besteht aus Kollagenen. Kollagen Typ I kommt vor allem in Haut, Knochen, Sehnen, Blutgefäßwänden und auch im Dentin vor und macht über 80 % des Gesamtkörperkollagens aus [95].

Die Immunhistochemie dient hier dem Nachweis von Kollagen Typ I im periimplantären Knochengewebe während der Implantateinheilung. Sie erfolgt mit Hilfe kreuzreaktiver Antikörper nach dem Protokoll Strept AB-Komplex HRP (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland). Diese Nachweise können insbesondere bei den beiden frühen Beo-

bachtungszeitpunkten dazu dienen, Aktivitätsbereiche im Rahmen der Knochenneubildung darzustellen und so frühzeitig die unterschiedlichen reparativen Kapazitäten der verschiedenen Gruppen festzustellen.

Die immunhistochemische Aufarbeitung von 30 µm-Schnitten erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zwecks Überführung der Präparate in die wässrige Phase wurden diese in einer absteigenden Alkoholreihe entacryliert (Tab. 9):

Tabelle 9: Absteigende Alkoholreihe

1. – 2. Tag:	100 %-iges Ethanol
3. – 4. Tag:	100 %-iges Ethanol
5. – 6. Tag:	96 %-iges Ethanol
7. – 8. Tag:	96 %-iges Ethanol
9. – 10. Tag:	75 %-iges Ethanol
11. – 12. Tag:	50 %-iges Ethanol

Dann folgte der Andau zur Demaskierung der darzustellenden Epitope sowie zur Lösung von Aldehydvernetzungen zwischen den Proteinen (Tab. 10):

Tabelle 10: Andauvorgang

Reagenz	Zeit (min)	Temperatur
10 % EDTA (pH 7,2)	20	Raumtemperatur
fließendes Leitungswasser	10	
aqua dest.	3 x 2	
TBS	3 x 2	
Trypsin (pH 7,8; INC)	15	37 °C
fließendes Leitungswasser	10	
aqua dest.	3 x 2	
TBS	3 x 2	

Um eine hohe Spezifität der Färbung an der später zur Farbkonversion eingesetzten Meerrettichperoxidase zu erhalten, erfolgte die Hemmung der endogenen Peroxidase mit H_2O_2 , (Tab. 11):

Tabelle 11: Peroxidasehemmung

Reagenz	Zeit (min)	Temperatur
3%-iges H_2O_2 in TBS (1 : 10)	15	Raumtemperatur
TBS	3 x 2	

Zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch Anlagerung von Primär- und Sekundärantikörpern an Proteine wurden die Präparate mit Normalserum infiltriert (Tab. 12):

Tabelle 12: Normalseruminfiltration

Reagenz	Zeit (min)	Temperatur
normales Kaninchenserum (Dako X0902) verdünnt (1 : 5) mit Antibodydiluent (Dako 2022)	30	Raumtemperatur

Nach Aufbringen des Primärantikörpers wurden die Präparate über Nacht inkubiert (Tab. 13):

Tabelle 13: Primärantikörperinfiltration

Reagenz	Zeit	Temperatur
Anti-Col I mit Antibodydiluent (Dako X0902) (1 : 4000)	über Nacht	4 °C
TBS	3 x 2	

Es folgte das Auftragen des Sekundärantikörpers. Dieser war biotinyliert, um im nächsten Schritt die Brücke zum Farbkonversionsenzym schlagen zu können. An Streptavidin gebundene Meerettichperoxidase erfüllte diese Aufgabe (Tab. 14):

Tabelle 14: Sekundärantikörperinfiltration

Reagenz	Zeit (min)	Temperatur
biotinyliert Kaninchen:Maus (1:400) (Dako E0464) mit TBS	30	Raumtemperatur
TBS	3 x 2	
Strept AB/HRP (Dako K0377) mit TBS	30	Raumtemperatur
TBS	3 x 2	

Anschließend wurde das Chromogen AEC zur Farbkonversion aufgetragen (Tab. 15):

Tabelle 15: Chromogenauftrag

Reagenz	Zeit (min)	Temperatur
AEC (Dako)	15	Raumtemperatur
aqua dest.	5	

Die Gegenfärbung wurde mit Häkalaun nach Lille durchgeführt (Tab. 16). Im letzten Schritt erfolgte das Eindecken der Präparate mit Faramount in der wässrigen Phase, um ein Auswaschen des roten Reaktionsproduktes des AEC zu verhindern.

Tabelle 16: Gegenfärbung mit Häkalaun nach Lille

Reagenz	Zeit (min)	Temperatur
Häkalaun n. Lille (Dako)	10	Raumtemperatur
Leitungswasser	5	
aqua dest	5	

3.12 Mikroradiographie

Die Mikroradiographie ist ein Verfahren zur radiologischen Abbildung histologischer Objekte. Hierbei wird die unterschiedliche Schwächung der Röntgenstrahlen durch verschiedene Gewebe beim Durchstrahlen ausgenutzt. Um einen guten Kontrast zwischen den Gewebekomponenten zu erhalten, wird mit weichen Röntgenstrahlen der Wellenlänge zwischen 0,01 und 1 nm gearbeitet. Bei der Kontaktmikroradiographie werden die Schliffpräparate direkt auf die Emulsionsseite des Röntgenfilms aufgebracht, wodurch eine Abbildung im Maßstab von annähernd 1:1 erreicht wird.

Die 100 µm dicken Schliffe wurden mit Hilfe des Faxitron Röntgengerätes (Faxitron, Rohde & Schwarz GmbH & Co. KG, Werk Köln, Deutschland) unter Zuhilfenahme konventioneller Zahnfilme (Agfa ZF, AGFA Deutschland, Köln, Deutschland) im Sinne der Kontaktmikroradiographie geröntgt, digitalisiert und mit Hilfe des Softwareprogrammes KS 300 (Zeiss, Jena, Deutschland) nach den Vorgaben von Matsui et al. [96] evaluiert. Die mikroradiographische Auswertung gibt Aufschluss über den Anteil an mineralisiertem Knochen in der zu untersuchenden Region sowie über den BIC.

3.13 Statistische Tests

In statistischen Testverfahren wird an Hand von Stichproben untersucht, ob die ermittelten Ergebnisse durch eine zufallsbedingte Streuung der Messwerte zu erklären sind (Nullhypothese H_0) oder, ob ein tatsächlicher Effekt vorliegt (Alternativhypothese H_1).

Es wird kalkuliert, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich das ermittelte Ergebnis zufällig eingestellt haben könnte, wenn H_0 tatsächlich zutrifft. Wird diese Wahrscheinlichkeit als gering eingestuft, nämlich kleiner als das vereinbarte Signifikanzniveau α , kann H_0 verworfen und das Ergebnis als signifikant angeführt werden. Das Signifikanzniveau α entspricht der Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art, der dadurch charakterisiert ist, dass die Nullhypothese (H_0) zutrifft, aber aufgrund der Stichprobe verworfen wird. Das zufallsbedingte Ergebnis wird fälschlich als signifikant bezeichnet. Um Fehler dieser Art

kontrollieren zu können, legt man das Signifikanzniveau vorab fest (in der Regel $\alpha=0,05$).

Mit Hilfe statistischer Testverfahren werden aus den Beobachtungsdaten die jeweilige Testgröße (in der vorliegenden Arbeit: Mann-Whitney-U-Test mit 95% Konfidenzintervall) sowie der dazugehörige p -Wert ermittelt. Der p -Wert bezeichnet die Wahrscheinlichkeit mit der sich die ermittelten Ergebnisse zufällig ergeben haben könnten. Er formuliert die zutreffende Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn man die Nullhypothese H_0 ablehnt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS V 15.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie

Die in der Immunhistochemie angefertigten Präparate, die dem qualitativen Nachweis von Kollagen I dienen und damit auf Aktivitätsbereiche im Rahmen der knöchernen Implantateinheilung schließen lassen sollten, waren für eine entsprechende Auswertung nicht verwendbar. Der Grund hierfür war, dass die Färbeergebnisse der in der Anzahl ohnehin geringen Präparate auch bei gleicher Beschichtung und gleichem Opferungszeitpunkt sehr uneinheitlich waren. Das rote Reaktionsprodukt des verwendeten Chromogens (AEC) war nur in einem Teil der Präparate darstellbar.

Zur Demonstration sind auf der folgenden Seite beispielhaft drei Präparate für mit coll/3er-combi beschichtete Implantate 14 Tage post implantationem abgebildet (Abb. 8A – 8C). So zeigt die Abb. 8A eine diffuse Verteilung von Kollagen I in der Knochenmatrix, wobei dies insbesondere im Bereich der Implantatgewinde lokalisiert ist. Die Gegenfärbung erfolgte mit verdünntem Hämalaun, um die immunhistochemische Färbung nicht zu überdecken. Daher erscheinen die auf die Chromogenfärbung negativ reagierenden Zellkerne blau. Im Vergleich zur Abb. 8A ist in der Abb. 8B ein bandförmiger Kollagen I-Nachweis entlang der Implantatoberfläche erkennbar, während im Präparat 8C überhaupt keine Kollagen I-Darstellung möglich war. Auch hier zeigen sich die negativen Zellkerne in blau. Die Implantatbereiche in den drei Präparaten weisen hinsichtlich der Menge und Farbintensität unterschiedliche Artefakte auf.

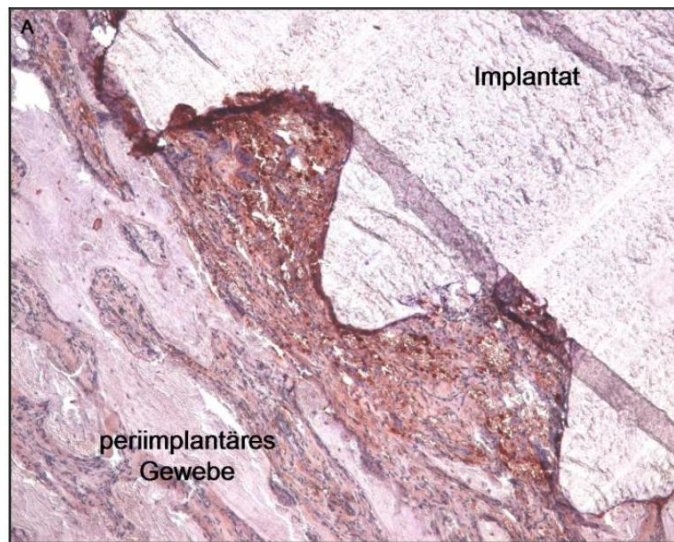


Abb. 8A:

coll/3er-combi

Präparat 14 Tage postimplantationem

Kollagen I-Färbung

Vergrößerung 1:20

Diffuse Verteilung von Kollagen I in der Knochenmatrix im Bereich der Implantatgewinde (rot).

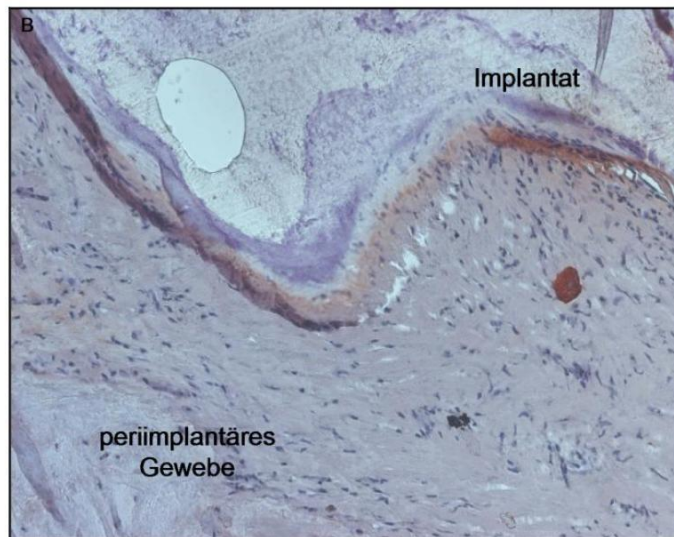


Abb. 8B:

coll/3er-combi

Präparat 14 Tage postimplantationem

Kollagen I-Färbung

Vergrößerung 1:20

Bandförmiger Kollagen I-Nachweis entlang der Implantatoberfläche (rot).

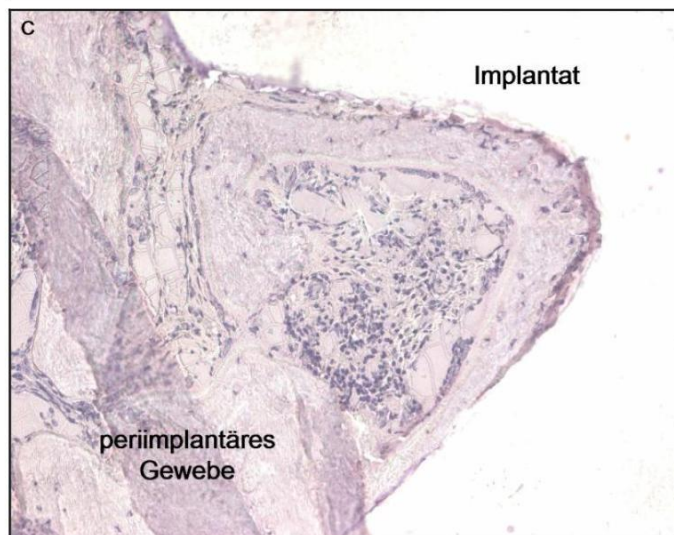


Abb. 8C:

coll/3er-combi

Präparat 14 Tage postimplantationem

Kollagen I-Färbung

Vergrößerung 1:20

Fehlende Kollagen I-Darstellung.

4.2 Histomorphometrie

Bei der histologischen Beurteilung der Schliffpräparate zeigte sich, dass sowohl bei den beschichteten Implantaten als auch bei den unbeschichteten Kontrollkörpern bereits am 3. Tag nach der Implantation vom Wirtsknochen ausgehend insbesondere im Bereich der Implantatgewinde (= Zone des Knochendefekts infolge der Implantatstollenaufbereitung bzw. Implantation) Osteoid darstellbar ist. Zwischen der Implantatoberfläche und dem Gewebe ist mikroskopisch ein Spalt sichtbar, d. h. es besteht noch keine direkte Verbindung zwischen Knochen und Beschichtung bzw. Implantat. Die Beschichtung weist innerhalb eines Schliffes oft unterschiedliche Dicken auf und platzt bei einem Teil der Proben vom Metallsubstrat ab (Abb. 9 und 10A – 10C).

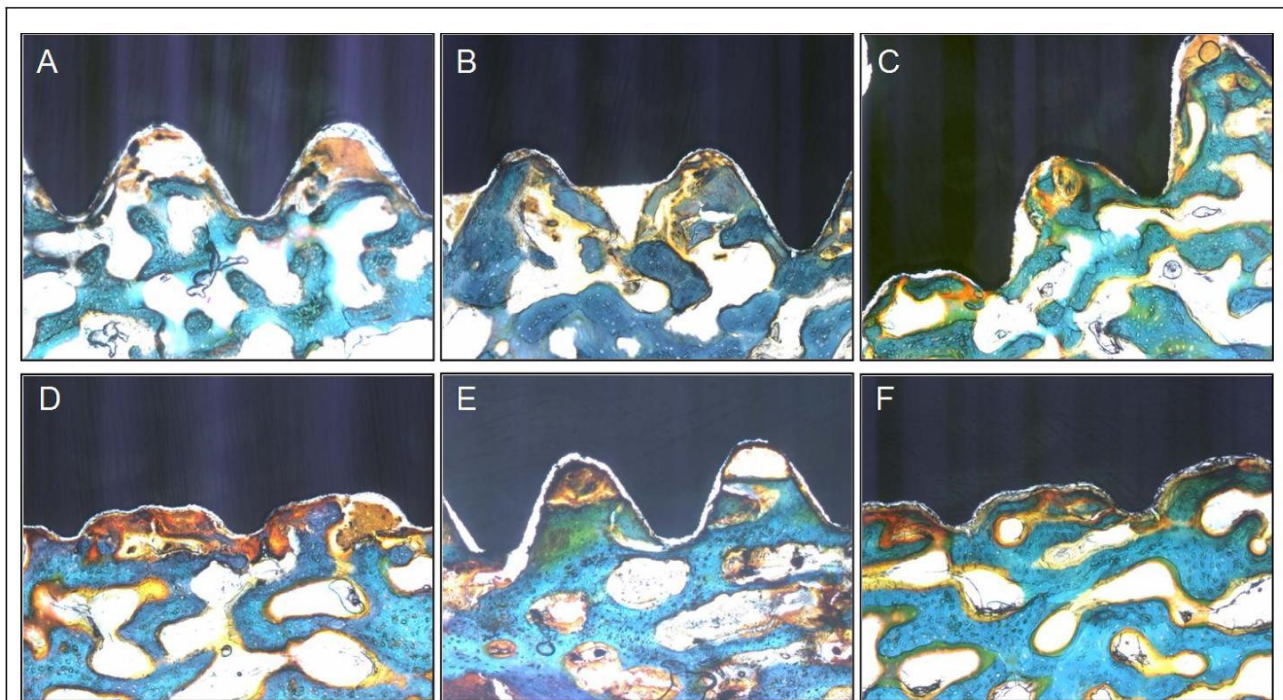


Abb. 9:

Präparate 3 Tage post implantationem, Masson-Trichrom-Goldner-Färbung, Vergrößerung 1:10, orange = Osteoid, türkis = mineralisierter Knochen, schwarz = Metall.

A) Kontrolle (unbeschichtet), B) coll, C) coll/bFGF, D) coll/VEGF₁₆₅, E) coll/rhBMP2, F) coll/3er-combi

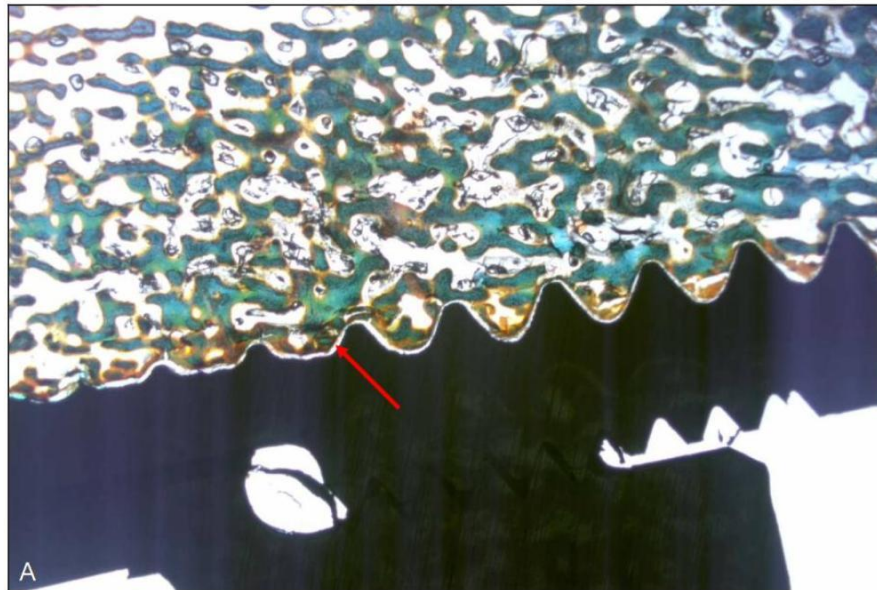


Abb. 10A:

coll/3er-combi

**Präparat 3 Tage post
implantationem**

**Masson-Trichrom-Goldner-
Färbung**

Vergrößerung 1:2,5

**orange = Osteoid, türkis =
mineralisierter Knochen,
schwarz = Metall**

**erkennbarer Spalt zwischen
Osteoid/Knochen und Implan-
tat (Pfeil)**

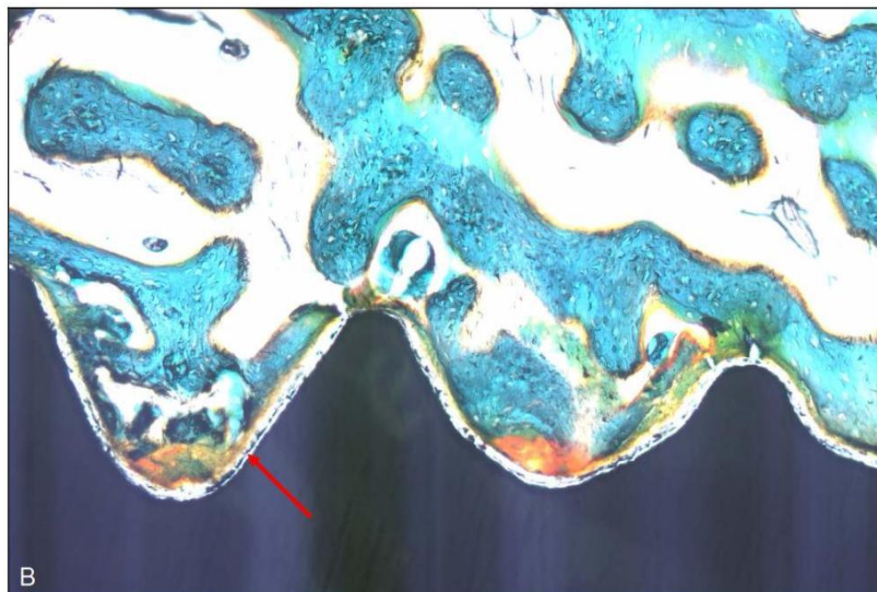


Abb. 10B:

coll/3er-combi

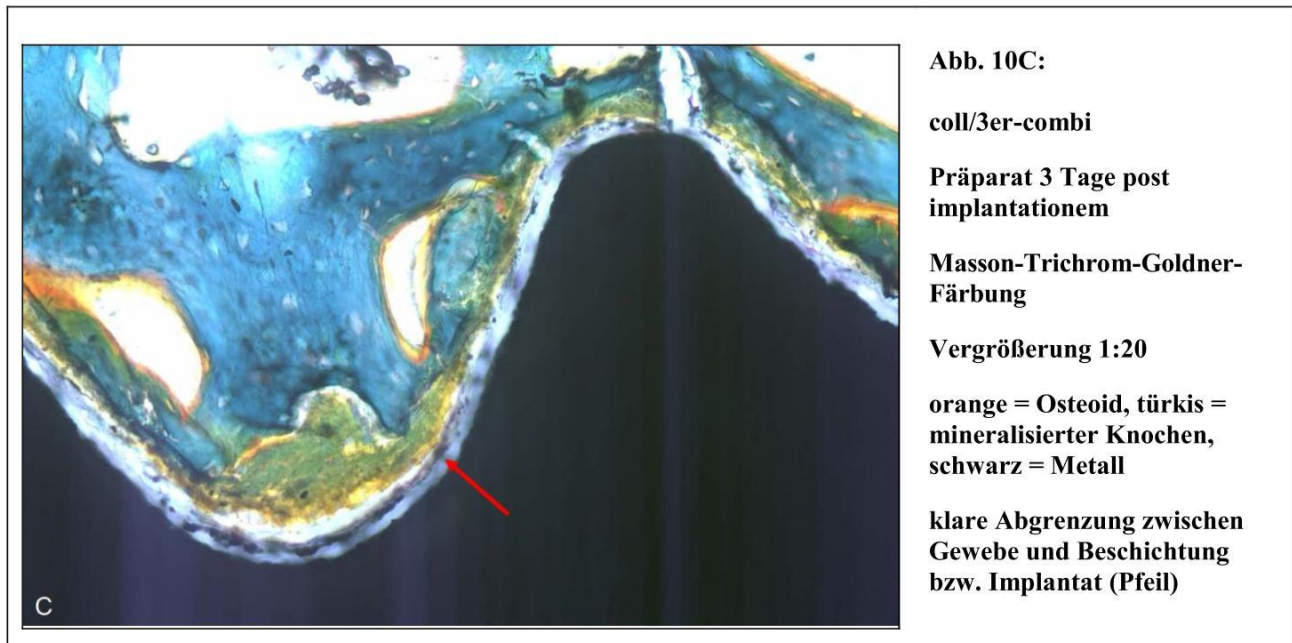
**Präparat 3 Tage post
implantationem**

**Masson-Trichrom-Goldner-
Färbung**

Vergrößerung 1:10

**orange = Osteoid, türkis =
mineralisierter Knochen,
schwarz = Metall**

**unterschiedlich dicke, zum
Teil abgelöste Beschichtung
(Pfeil)**



Bereits am 14. Tag nach der Implantation liegen bei einigen Präparaten die neu gebildeten Knochenbälckchen der Implantatoberfläche ohne trennende Bindegewebsschicht direkt auf. Dabei sind mikroskopisch noch Reste der Beschichtung nachweisbar (Abb. 11).

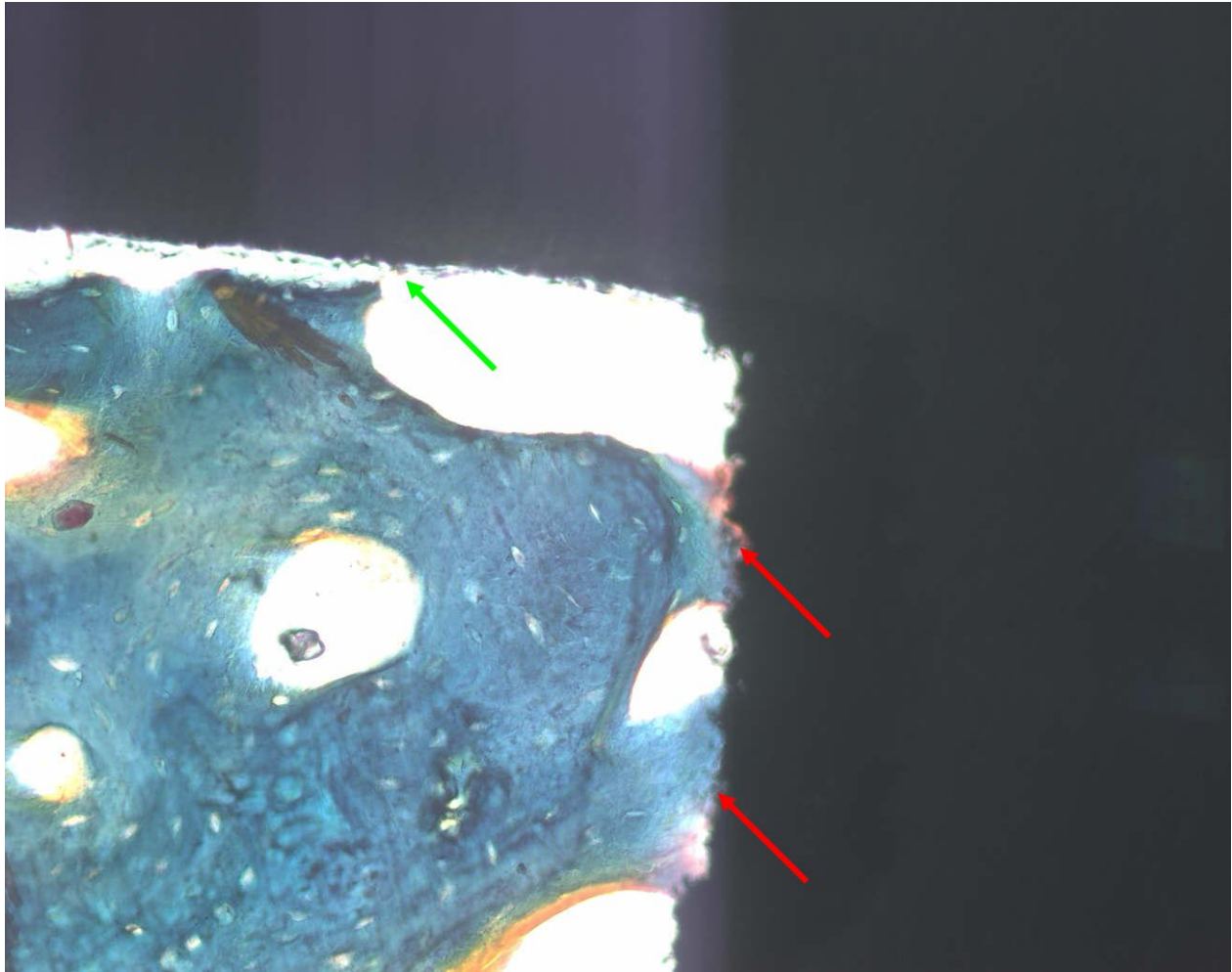


Abb. 11:

coll/3er-combi, Präparat 14 Tage post implantationem, Masson-Trichrom-Goldner-Färbung, Vergrößerung 1:20, orange = Osteoid, türkis = mineralisierter Knochen, schwarz = Metall.

Direkter Knochenanschluss an Implantatoberfläche (rote Pfeile) bei noch vorhandenen Resten der Beschichtung (grüner Pfeil).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden anhand der Histomorphometrie die Knochenneubildung und Osteointegration nicht quantitativ erfasst, da die Mikroradiographie hinsichtlich der im Kapitel „Ziel der Arbeit“ formulierten Fragestellung der Histomorphometrie überlegen ist.

4.3 Polychrome Sequenzmarkierung

Die qualitative Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung zeigte in allen Fällen ein konventionelles Knochenwachstum, ausgehend vom Lagerknochen in Richtung der Implantatoberfläche (implantopetale Wachstumsrichtung). Eine so genannte Bandenumkehr mit einer primären Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche und implantofugaler Wachstumsrichtung hin zum Lagerknochen ließ sich in keinem der Präparate nachweisen. Zur Veranschaulichung sind nachfolgend Photographien von Beispielpärparaten für die vier verschiedenen Zytokinbeschichtungen (coll/rhBMP2, coll/VEGF₁₆₅, coll/bFGF, coll/3er-combi) abgebildet (Abb. 12).

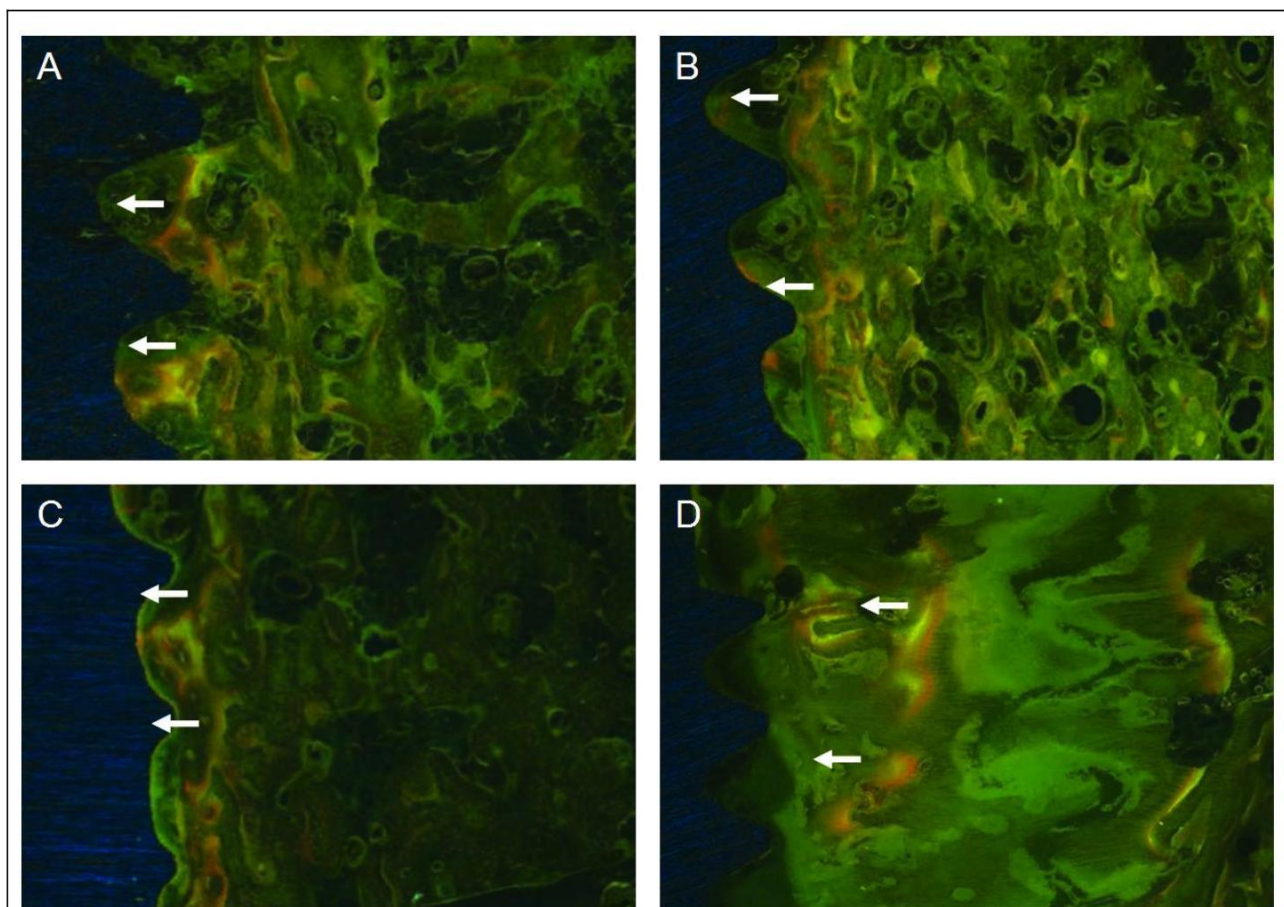


Abb. 12:

Fluoreszenzfarbstoffbanden in der polychromen Sequenzmarkierung (Opferung 56 Tage post implantationem), Vergrößerung 1:10. Bei allen Implantatbeschichtungen zeigt sich konventionelles Knochenwachstum, ausgehend vom Lagerknochen in Richtung Implantatoberfläche (Pfeil).

A) coll/bFGF, B) coll/VEGF₁₆₅, C) coll/rhBMP2, D) coll/3er-combi

Eine quantitative Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da dies für die im Kapitel „Ziel der Arbeit“ formulierte Fragestellung irrelevant ist. Bei dem relativ kurzen Untersuchungszeitraum (56 Tage) sind die Fluoreszenzbanden zudem nicht ausreichend voneinander abgrenzbar, was keine quantitative Analyse erlaubt.

4.4 Mikroradiographie

4.4.1 Deskriptive Beurteilung der Mikroradiographien

Anhand der mikroradiographischen Bilder (Vergrößerung 1:10) ist bereits augenscheinlich die knöcherne Einheilung der Implantate zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten post implantationem im Verlauf nachzuvollziehen. Dies lässt sich insbesondere am Beispiel der infolge der Implantatstollenaufbereitung entstandenen Bohrlochdefekte unterhalb der eingebrachten Implantate demonstrieren. So zeigt sich in vielen Fällen am 5. bzw. 7. Tag nach der Implantation ein deutlich sichtbarer und zum umgebenden Knochen noch klar abgegrenzter Gewebedefekt (Abb. 13A). Am 14. postoperativen Tag weisen die Defektbereiche vom Wirtsknochen ausgehende knöcherne Zonen auf (Abb. 13B). Am 28. Tag post implantationem sind die Bohrlochdefekte zum Teil vollständig mit neu gebildetem Knochen ausgefüllt. Das Knochengeflecht ist hierbei dichter als beim ursprünglichen Gewebe, so dass eine Abgrenzung zu diesem noch möglich ist. Im Vergleich zum originären Gewebe erscheint auch im Bereich der Implantatgewinde das Knochengefüge dichter (Abb. 13C). Am 56. postoperativen Tag ist ein vollständig ausgeheilter Bohrlochdefekt ohne erkennbaren Strukturunterschied zum Umgebungsgewebe darstellbar. Lediglich unmittelbar periimplantär weist der Knochen weiterhin eine kompaktere Formation auf (Abb. 13D).

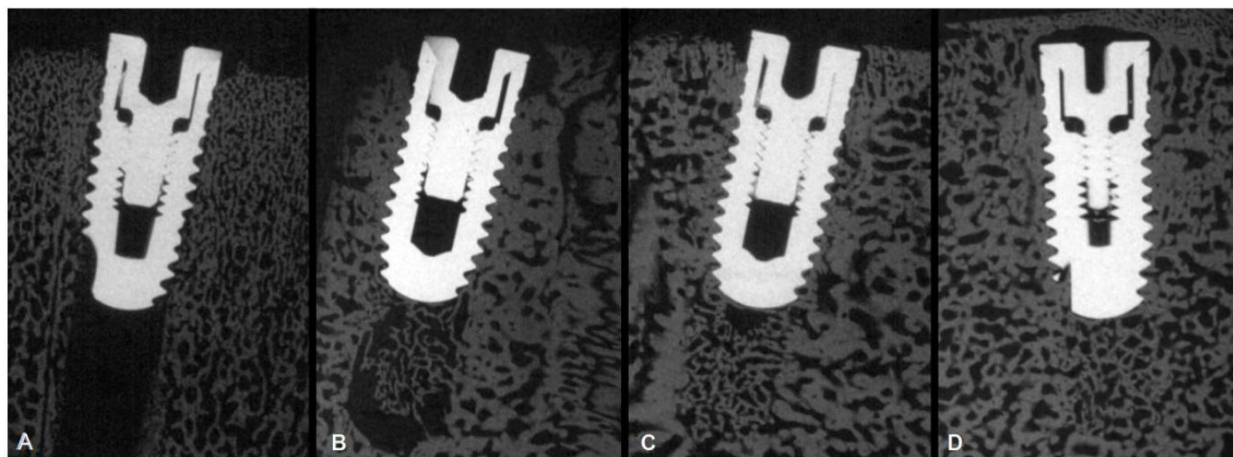


Abb. 13:

Mikroradiographie, Vergrößerung 1:10. Darstellung des Bohrlochdefekts unterhalb des Implantates im zeitlichen Verlauf.

- A) coll) /rhBMP2, 5. Tag post implantationem: deutlich sichtbarer Bohrlochdefekt
- B) coll/VEGF₁₆₅, 14. Tag post implantationem: Knochenneubildung im Defektbereich
- C) coll/bFGF, 28. Tag post implantationem: Defekt mit neugebildetem Knochen ausgefüllt, jedoch noch abgrenzbar
- D) coll, 56. Tag post implantationem: restitutio ad integrum

4.4.2 Ermittlung des Bone-Implant-Contact (BIC) und statistische Auswertung

4.4.2.1 Evaluierung der Mikroradiographien

Vor der Erfassung des Bone-Implant-Contact erfolgte eine Evaluierung der Mikroradiographien. Implantate, die nicht bzw. nicht ausreichend im Knochen standen, wurden aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen (Abb. 14). Letzten Endes wurden für den 5., 14., 28. und 56. Tag post implantationem jeweils 24 Implantate, insgesamt also 96 Implantate, für die statistische Analyse herangezogen (Tab. 17 und 18).

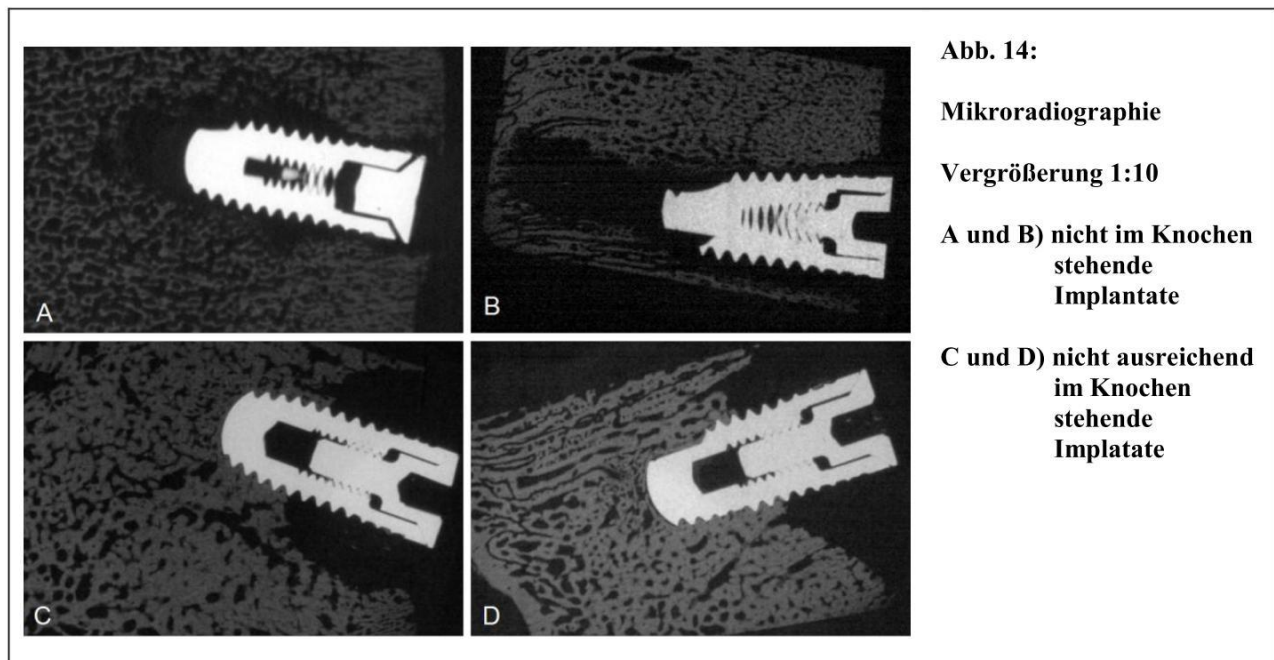


Tabelle 17: Anzahl untersuchter Mikroradiographien je Untersuchungszeitpunkt

Beschichtung Konzentration	Kontrolle	coll	coll/bFGF	coll/VEGF ₁₆₅	coll/rhBMP2	coll/3er-combi	Summe
1 µg	Konzentration	Konzentration	2	2	2	2	12
10 µg	irrelevant: 4	irrelevant: 4	2	2	2	2	12
Summe	4	4	4	4	4	4	<u>24</u>

Tabelle 18: Analyisierte Untersuchungszeitpunkte und Summe der untersuchten Mikroradiographien

Untersuchungszeitpunkt	Anzahl Mikroradiographien
5. Tag post implantationem	24
14. Tag post implantationem	24
28. Tag post implantationem	24
56. Tag post implantationem	24
Summe	<u>96</u>

4.4.2.2 Ergebnisse in der Übersicht

Zur übersichtlicheren Darstellung sind nachfolgend für die jeweiligen Untersuchungszeitpunkte die ermittelten BIC sowie die statistischen Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst (Tab. 19A – D). Hierbei erfolgte keine getrennte Auswertung bzgl. der verschiedenen Zytokinkonzentrationen, da sich die jeweiligen BIC prozentual nur gering unterschieden und keine Signifikanzen zu erwarten waren.

Tabelle 19A: Übersicht statistische Auswertung, 5. Tag post implantationem

	Beschichtung					
	Kontrolle	coll	coll/bFGF	coll/VEGF₁₆₅	coll/rhBMP2	coll/3er-combi
BIC %	31,6	37,3	47,4	29,2	26,6	54,6
	28,0	22,4	27,6	43,8	29,1	37,6
	31,0	30,0	35,0	32,0	27,0	43,0
	29,0	32,0	38,0	38,0	27,0	42,0
Median	28,5	26,2	31,3	30,6	26,8	39,8
arith. Mittel	29,9	30,4	37,0	34,5	27,4	44,2
p-Wert		0,715	0,144	0,273	0,144	0,068

Tabelle 19B: Übersicht statistische Auswertung, 14. Tag post implantationem

	Beschichtung					
	Kontrolle	coll	coll/bFGF	coll/VEGF₁₆₅	coll/rhBMP2	coll/3er-combi
BIC %	33,0	59,7	43,4	48,1	45,6	45,0
	35,0	47,0	46,8	48,6	44,5	41,0
	38,0	53,4	42,0	37,4	58,4	48,0
	39,0	53,4	44,0	43,3	58,4	50,0
Median	34	50,2	42,7	40,1	45,1	43,0
arith. Mittel	36,3	53,4	44,1	42,3	51,7	46,0
p-Wert		0,068	0,068	0,465	0,068	0,068

Tabelle 19C: Übersicht statistische Auswertung, 28. Tag post implantationem

	Beschichtung					
	Kontrolle	coll	coll/bFGF	coll/VEGF ₁₆₅	coll/rhBMP2	coll/3er-combi
BIC %	38,2	47,7	72,0	52,8	48,4	44,1
	41,9	44,5	72,9	49,4	40,2	60,7
	75,1	45,0	79,8	63,1	45,0	48,0
	64,1	45,0	71,2	44,2	45,0	48,0
Median	40,1	44,8	71,6	46,8	42,6	46,1
arith. Mittel	54,8	45,6	74,0	52,3	44,7	50,2
p-Wert		0,465	0,068	0,715	0,273	0,715

Tabelle 19D: Übersicht statistische Auswertung, 56. Tag post implantationem

	Beschichtung					
	Kontrolle	coll	coll/bFGF	coll/VEGF ₁₆₅	coll/rhBMP2	coll/3er-combi
BIC %	81,9	73,7	85,7	54,5	66,2	80,0
	82,0	76,1	67,0	56,5	73,7	70,0
	70,0	80,0	61,9	43,2	53,3	80,0
	70,0	70,0	53,4	64,0	53,3	70,0
Median	76,0	71,9	57,7	55,5	59,8	75,0
arith. Mittel	76,0	75,0	60,3	54,6	61,6	75,0
p-Wert		1,000	0,068	0,068	0,068	0,593

Zur besseren Veranschaulichung erfolgte für die jeweiligen Untersuchungszeitpunkte eine graphische Darstellung der ermittelten Werte anhand eines Box-Whisker-Plots (Abb. 15A – D).

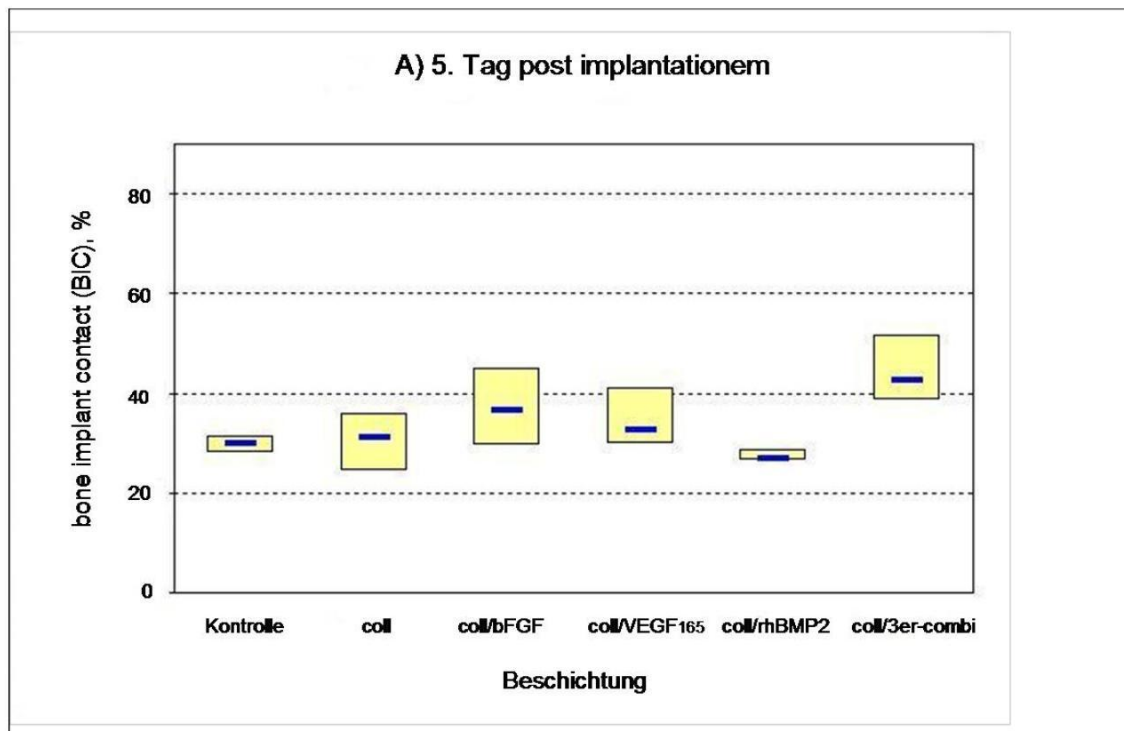


Abb. 15A: Darstellung der Werteverteilung anhand des Box-Whisker-Plots, 5. Tag post implantationem

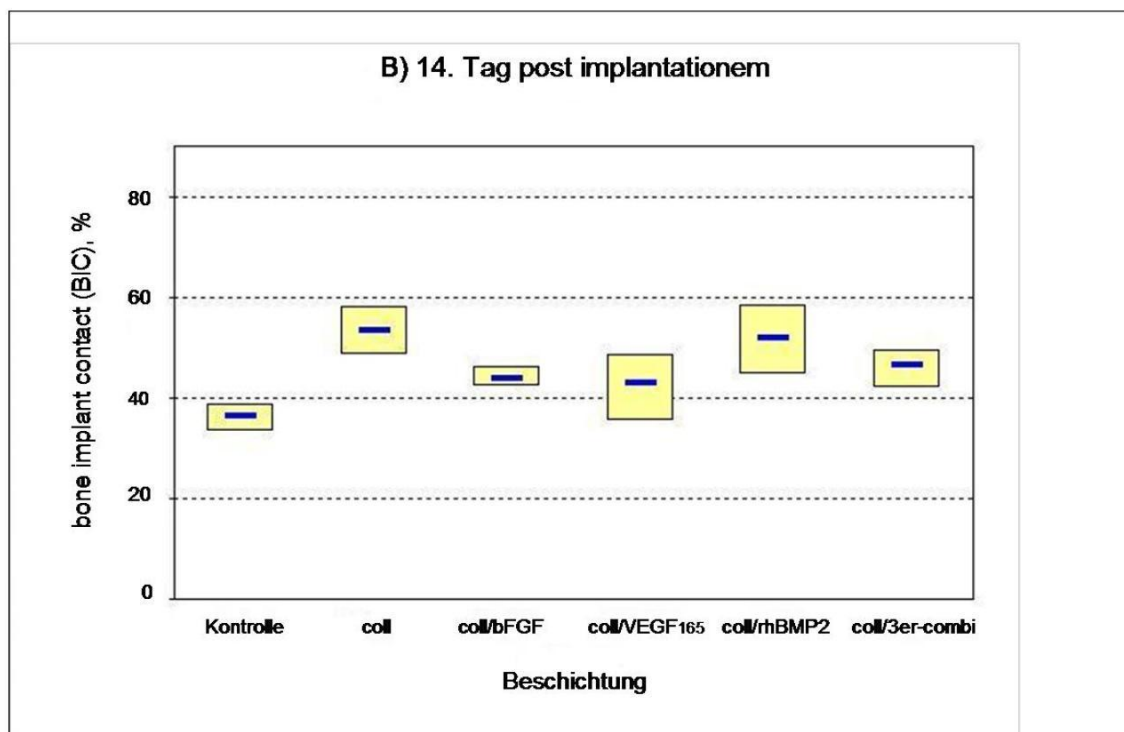


Abb. 15B: Darstellung der Werteverteilung anhand des Box-Whisker-Plots, 14. Tag post implantationem

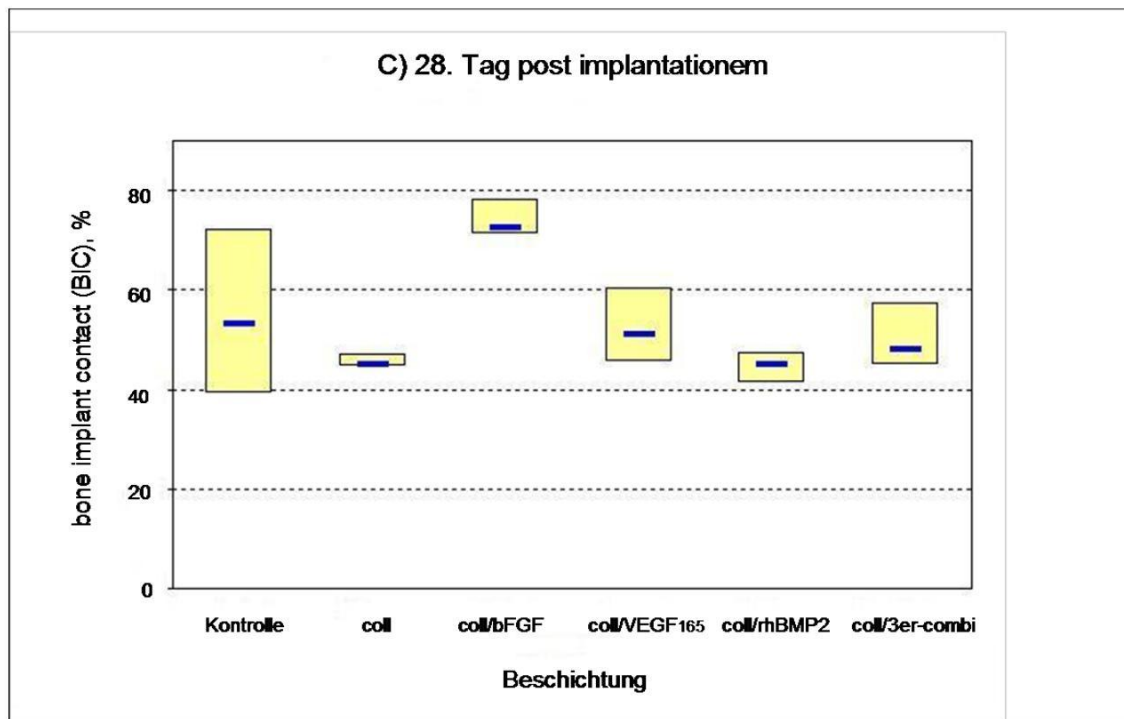


Abb. 15C: Darstellung der Werteverteilung anhand des Box-Whisker-Plots, 28. Tag post implantationem

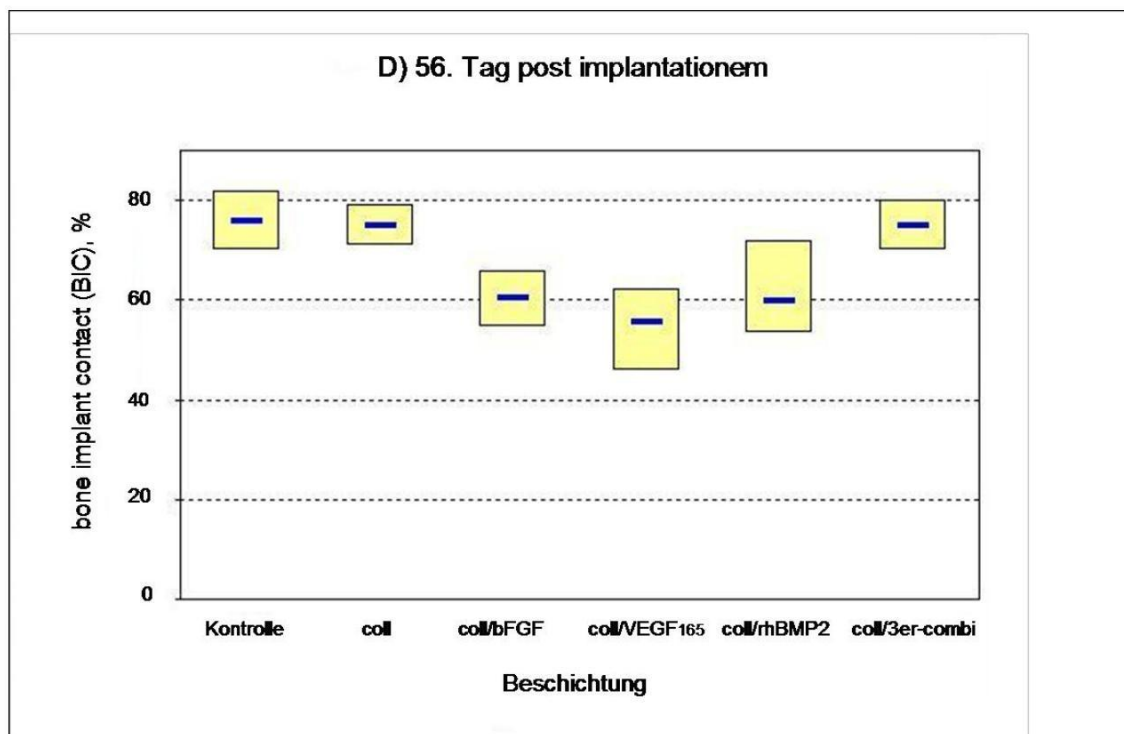


Abb. 15D: Darstellung der Werteverteilung anhand des Box-Whisker-Plots, 56. Tag post implantationem

Ebenfalls zur besseren Veranschaulichung erfolgte die graphische Darstellung des BIC (Mittelwert) für die jeweiligen Beschichtungen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im zeitlichen Verlauf (Abb. 16).

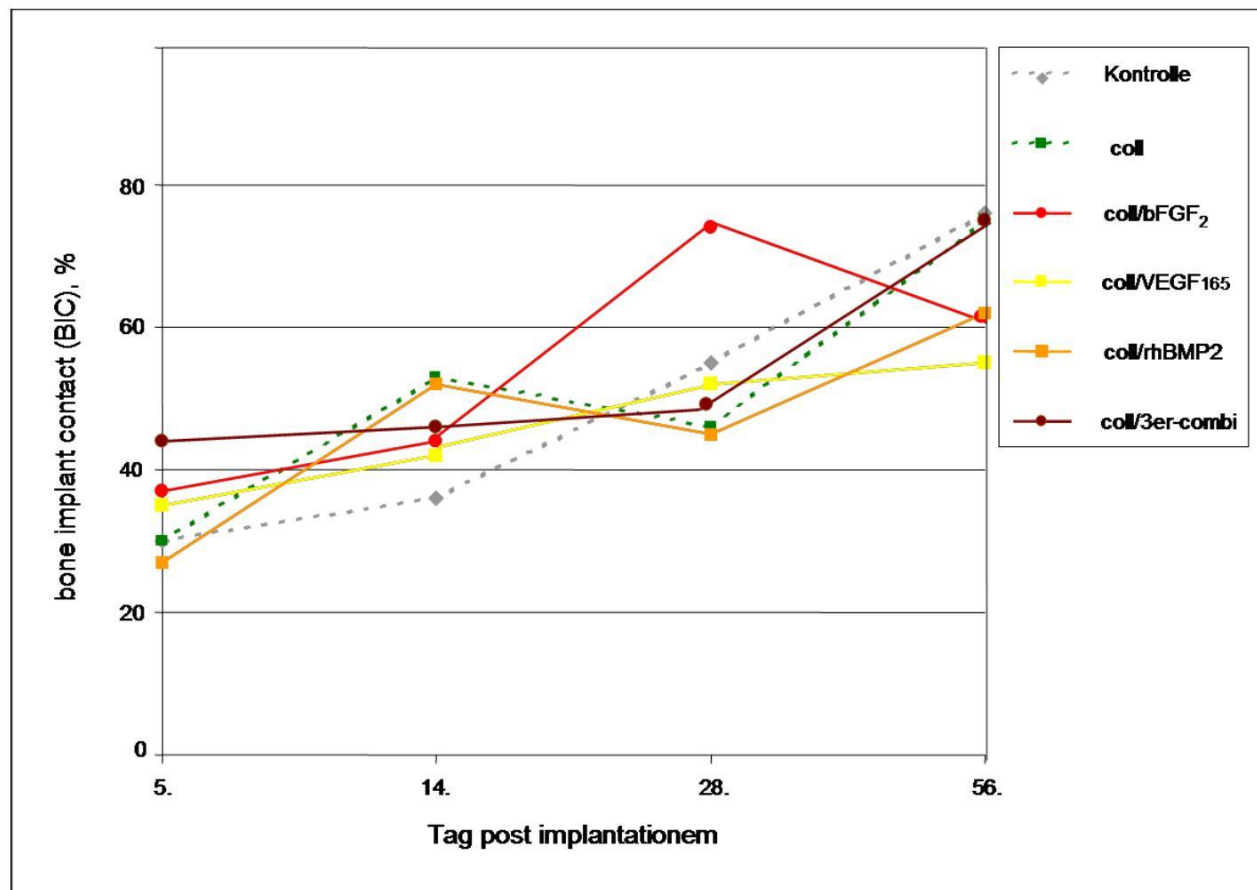


Abb. 16: Bone implant contact im zeitlichen Verlauf

4.4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Am 5. Tag post implantationem wurde für die Kontrolle ein BIC von durchschnittlich 29,9 % ermittelt. Coll, coll/bFGF, coll/VEGF₁₆₅ und coll/rhBMP2 wiesen im Vergleich hierzu einen BIC von 30,4 %, 37,0 %, 34,5 % bzw. 27,4 % auf. Es gab somit keine Signifikanzen ($p = 0,715, 0,144, 0,273$ bzw. $0,144$). Mit 44,2 % zeigte coll/3er-combi den höchsten BIC. Aber auch dies stellte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle dar ($p = 0,068$).

Am 14. Tag post implantationem wies die Kontrolle den niedrigsten BIC auf: 36,3 %. Für coll/bFGF, coll/VEGF₁₆₅ und coll/3er-combi lag der BIC bei 44,1 %, 42,3 % bzw. 46,0 % und unterschied sich ebenso wie coll und coll/rhBMP2, die die höchsten BIC (53,4 % bzw. 51,7 %) zeigten, nicht signifikant von der Kontrolle ($p = 0,068, 0,465, 0,068, 0,068$ bzw. $0,068$).

Am 28. Tag post implantationem wiesen coll, coll/VEGF₁₆₅, coll/rhBMP2 und coll/3er-combi einen BIC von 45,6 %, 52,3 %, 44,7 % bzw. 50,2 % auf und unterschieden sich somit nicht signifikant von der Kontrolle, für die ein BIC von 54,8 % ermittelt wurde ($p = 0,465, 0,715, 0,273$ bzw. $0,715$). Mit großem Abstand den höchsten BIC zeigte coll/bFGF: 74,0 %. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle resultierte daraus jedoch nicht ($p = 0,068$).

Am 56. Tag post implantationem wurden die höchsten BIC für die Kontrolle (76,0 %), coll (75,0 %) und coll/3er-combi (75,0 %) ermittelt. Coll/VEGF₁₆₅ und coll/rhBMP2 zeigten einen BIC von 54,6 % bzw. 61,6 %. Beim coll/bFGF, welches am 28. Tag post implantationem einen BIC von 74,0 % aufwies, lag der Wert nun bei 60,3 %. Signifikanzen wurden nicht festgestellt ($p = 1, 0,593, 0,068, 0,068$ bzw. $0,068$).

5. Diskussion

Basierend auf den Arbeiten von Brånemark et al. (1969) ist die Option einer Osseointegration für Titanimplantate mittlerweile unbestritten [13]. Definitionsgemäß handelt es sich bei der Osseointegration um einen direkten, funktionellen und strukturellen Verbund zwischen dem organisierten, lebenden Knochen und der Oberfläche eines belasteten Implantates [9]. Diese „funktionelle Ankylose“ [97] gilt heute als wichtige Voraussetzung für die klinisch erfolgreiche Anwendung enossaler Implantate. Faktoren für eine erfolgreiche Osseointegration sind Patientenselektion, Knochenquantität, Knochenqualität, Implantatmaterial, Oberflächenbeschaffenheit, Implantatform, Belastungsbedingungen, Implantationsplanung, chirurgisches Vorgehen, Suprastruktur, Okklusion, Mundhygiene und Nachsorge [9, 98].

Der Osseointegrationsvorgang wird in drei Phasen unterteilt. Während der ersten Phase kommt es infolge osteokonduktiver Migration von undifferenzierten Bindegewebszellen und differenzierten osteogenetischen Zellen zur Bildung von Geflechtknochen. Dieser ist durch eine zufällige Anordnung von Kollagenfasern, zahlreiche, unregelmäßig geformte Osteozyten und anfangs durch eine relativ geringe Mineralisierung charakterisiert [99, 100]. Die zweite Phase ist von einer zunehmenden Mineralisation der Knochenmatrix geprägt, so dass der typische Lamellenknochen entsteht. Lamellärer Knochen besitzt einen hohen Mineralisationsgrad und besteht vorwiegend aus Osteozyten sowie dicht gepackten, parallel angeordneten Kollagenfaserschichten mit alternierender Verlaufsrichtung, was diesem eine hohe Stabilität verleiht [100]. Die dritte Phase der Osseointegration dient der Anpassung des Knochens an die Belastung und hält lebenslang an. Die hier ablaufenden Remodellationsprozesse sind ausführlich beschrieben [100-103].

Im Rahmen der Diskussion der Umstände, die überhaupt zu einem direkten Knochen-Implantat-Kontakt führen, wurden die Begriffe Distanz- und Kontaktosteogenese geprägt [104]. Auf verschiedene Weise resultiert aus beiden Vorgängen ein direkter Knochenkontakt zum Implantat, während anfangs noch ein vaskularisierter Granulationsgewebsspalt zwischen den Oberflächen vorliegt. Im Verlauf der weiteren Knochenheilung erfolgt bei der Distanzosteogenese eine vom ortsständigen Knochen ausgehende Knochenbildung bis an die Implantatoberfläche: zentripetales Wachstum. Bei der

Kontaktosteogenese dagegen migrieren osteogene Zellen durch den vaskularisierten Granulationsgewebsspalt, besiedeln direkt die Implantatoberfläche und bilden auf dieser neuen Knochen in Richtung ortsständigem Knochen: zentrifugales Knochenwachstum. Es wird davon ausgegangen, dass bei jeder enossalen Wundheilung beide Prozesse ablaufen [99].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es anhand eines Tiermodells zu untersuchen, ob sich bei beschichteten Dentalimplantaten im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten Vorteile hinsichtlich der Osseointegration aufweisen lassen. Neben kollagen I-beschichteten Implantaten wurden Implantate untersucht, die zusätzlich zu Kollagen I mit bFGF2, VEGF-A₁₆₅, rhBMP2 oder deren Kombination beschichtet waren. Als Kontrolle diente ein unbeschichtetes Titanimplantat mit mikrostrukturierter Oberfläche.

5.1 Wahl des Tiermodells

Die Untersuchung erfolgte an weiblichen Hausschweinen, weil zum einen der Schweineschädel in Struktur und Bezahnung dem des Menschen ähnlich ist und zum anderen beim Schwein Gewebedurchblutung, zirkulatorische Vorgänge und Frakturheilung mit den Verhältnissen beim Menschen vergleichbar sind [57-63].

5.2 Wahl der Beschichtungsmaterialien

Von den 16 bekannten BMPs besitzt BMP2 die größte osteoinduktive Fähigkeit [82-84], wobei die knocheninduzierende Potenz des natürlichen BMP2 nur in geringem Maße die des rekombinanten Proteins übertrifft [89]. Daher fiel in der vorliegenden Studie die Wahl auf rhBMP2 als Beschichtungsmaterial. Daneben wurden die Wachstumsfaktoren bFGF2 und VEGF-A₁₆₅ verwendet. Diese Zytokine weisen unter anderem eine entscheidende Funktion bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen der Angiogenese auf [65-67, 72-74]. Die Angiogenese ist wiederum ein essentieller Bestandteil der Knochenheilung [74]. BMP2 als organisches Implantatbeschichtungsmaterial wurde in der Vergangenheit eingehend erforscht, wobei

die Ergebnisse der entsprechenden Studien uneinheitlich sind [105]. Zum FGF existieren einige viel versprechende Tierstudien, in denen beispielsweise über ein erhöhtes Implantatausdrehmoment und BIC sowie erhöhte Werte in der Resonanzfrequenzanalyse berichtet wird [106, 107]. Für VEGF im Allgemeinen, und damit auch für VEGF-A₁₆₅, fiel die Literaturrecherche hinsichtlich der Verwendung als Implantatbeschichtungsmaterial negativ aus. Da bei der Angiogenese bekanntermaßen ein starker Synergismus zwischen der Wirkung von FGF und VEGF besteht [76], wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine VEGF-A₁₆₅-Beschichtung kreiert und analysiert.

Ob ein so genannter Carrier bei der Zytokinapplikation auf Implantatoberflächen essentiell für die biologische Aktivität ist, ist lange Zeit kontrovers diskutiert worden [108-111]. Einige Autoren sehen einen Carrier als Bedingung für eine biologische Aktivität von Wachstumsfaktoren [109]. Unabhängig von der Frage der biologischen Wirksamkeit in Abhängigkeit von einer solchen Trägersubstanz, scheint eine Immobilisierung des Wachstumsfaktors sinnvoll zu sein, um beispielsweise eine ektope Knochenbildung zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit diente Kollagen I als Trägersubstanz für die verwendeten Zytokine. Kollagen I ist die Hauptkomponente der organischen extrazellulären Knochenmatrix. Bei der Knochenneubildung bildet es die Leitstruktur für die einwandernden osteogenetischen Zellen und moduliert deren Differenzierung und Morphogenese durch Beeinflussung der chemischen und mechanischen Stimuli [50, 112]. Die Kollagen I-Expression gilt als früher, aber unspezifischer, Indikator für die Knochenneubildung [113]. In vitro führt Kollagen I zu einer erhöhten osteoblasten-assoziierten Genexpression [114, 115] und stimuliert die Mineralisation [116]. In diversen Studien wurden für kollagen-I-beschichtete Titanimplantate im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten höhere Knochenneubildungsraten und BICs beschrieben [44-46, 117-119]. Die genauen Mechanismen der Einflussnahme von Kollagenbeschichtungen auf die Osteointegration wurden bislang jedoch nur teilweise entschlüsselt [47, 48]. Entscheidend hierbei scheint der direkte Einfluss auf Zellgewebe-Wechselwirkungen, welche einen aktiven Prozess der Knochenbildung induzieren [49, 50].

5.3 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Zur qualitativen bzw. quantitativen Erfassung der Vorgänge während der knöchernen Implantateinheilung wurden die Prüfkörper immunhistochemisch, histomorphometrisch, fluoreszenzmikroskopisch und mikroradiographisch aufgearbeitet.

Die immunhistochemischen Präparate, die durch den Nachweis von Kollagen I der Darstellung der Aktivitätsbereiche während der periimplantären Knochenneubildung und damit der Evaluierung der reparativen Kapazitäten der verschiedenen Gruppen, insbesondere zu den frühen Beobachtungszeitpunkten, dienen sollten, wurden aufgrund der sehr uneinheitlichen Färbeergebnisse nicht ausgewertet. Zu Demonstrationszwecken erfolgte im Ergebnisteil lediglich eine deskriptive Darstellung anhand einiger Beispielpräparate. Die Ursache für dieses Fehlschlagen lässt sich nachfolgend nicht eruieren. Jedoch ist als kritischster Punkt der Immunhistochemie an Paraffinschnitten der enzymatische Andauvorgang zur Freilegung der Epitope, an die der Primärantikörper binden soll, zu werten [120]. Bei zukünftigen Studien ist daher zu erwägen, vor der eigentlichen Präparateherstellung zunächst eine Methodenetablierung anhand einiger Prüfkörper durchzuführen.

In der vorliegenden Studie ließ sich anhand der histomorphometrischen Präparate sowohl bei den beschichteten Implantaten als auch bei den unbeschichteten Kontrollkörpern bereits am 3. Tag nach der Implantation vom Wirtsknochen ausgehend Osteoid nachweisen, wobei zwischen Gewebe und Implantatoberfläche mikroskopisch noch ein Spalt existierte. Dagegen liegen bereits am 14. post implantationem bei einigen Präparaten die neu gebildeten Knochenbälkchen der Implantatoberfläche ohne trennende Bindegewebsschicht direkt auf, womit entsprechend den vorangegangenen Erläuterungen eine Osseointegration besteht [9].

Die Histomorphometrie ist eine übliche Methode zur Analyse des BIC. Jedoch ist beschrieben, dass die Mikroradiographie hinsichtlich der Messgenauigkeit des BIC der Histomorphometrie deutlich überlegen ist [121]. Vor diesem Hintergrund erfolgte in der vorliegenden Arbeit keine quantitative Auswertung der Knochenneubildung und Osseointegration anhand der histomorphometrischen Präparate.

Die Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung erbrachte ein vom ortständigen Knochen ausgehendes zentripetales Knochenwachstum. Auch wenn davon ausgegangen wird, dass im Rahmen der Implantateinheilung die Distanz- und Kontaktosteogenese parallel ablaufen [99], konnten Hinweise für letztere anhand unserer fluoreszenzmikroskopischen Präparate nicht aufgezeigt werden. Hierbei muss einschränkend angeführt werden, dass eine Reihe von Präparaten nicht zur Beurteilung des Bandenmusters herangezogen werden konnte, da die Banden in diesen Fällen nicht ausreichend von einander abgrenzbar waren. Als Ursache hierfür sind, insbesondere bei den frühen Untersuchungszeitpunkten, die relativ kurz aufeinander folgenden Zeitpunkte der Fluoreszenzfarbstoffapplikation (siehe Tabelle 1) zu werten. Hinsichtlich zukünftiger Studien ist daher ein längerer Untersuchungszeitraum mit deutlich größeren Abständen zwischen den Fluoreszenzfarbstoffinjektionen zu empfehlen, um ein auswertbares Bandenmuster zu erzielen. So nahmen Eckelt et al. (2007) beispielsweise bei einem Gesamtuntersuchungszeitraum von 22 Wochen die polychrome Sequenzmarkierung mit vergleichbaren Injektionsdosen wie in der vorliegenden Arbeit eine, drei, fünf und sieben Wochen nach der Implantatinserterion vor. Die Auswertung ergab in den meisten Fällen eine konventionelle Wachstumsrichtung neugebildeten Knochens, ausgehend vom Lagerknochen in Richtung Implantatoberfläche. Für Implantatoberflächen, die mit einer Kombination von Kollagen I und Chondroitinsulfat beschichtet wurden konnte allerdings in einzelnen Fällen eine so genannte Bandenumkehr mit einer primären Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche und nachfolgender implantofugaler Wachstumsrichtung hin zur Peripherie gezeigt werden [122].

Ein Großteil der Präparate musste bei der statistischen Auswertung des BIC anhand der Mikroradiographien ausgeschlossen werden. Hierbei handelte es sich um Implantate, die nicht bzw. nicht ausreichend im Knochen standen. Da alle Implantatinserterionen durch denselben Operateur erfolgten, und bei der Entnahme der Prüfkörper in den meisten Fällen die Implantate als fest im Knochen stehend zu werten waren, sind als mögliche Ursache für diese Verluste in erster Linie Aufbereitungsartefakte zu nennen.

Die Analyse der verbliebenen 96 Implantate ergab im Vergleich zu anderen Studien keine Versuchsgruppe, die zu allen Untersuchungszeitpunkten den höchsten oder niedrigsten BIC aufwies. Eckelt et al. (2007) beispielsweise referieren bezüglich der von ihnen

untersuchten Beschichtungen (1. Kollagen I, 2. Kollagen I/Chondroitinsulfat, 3 Kollagen I/Chondroitinsulfat/BMP4) über einen solchen Kurvenverlauf [122].

Bei Betrachtung der BIC-Mittelwerte für die jeweiligen Beschichtungen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im zeitlichen Verlauf war in der vorliegenden Studie für die Kontrolle, coll/VEGF₁₆₅, und coll/3er-combi ein kontinuierlicher Anstieg des BIC zu verzeichnen, während die anderen drei Beschichtungen im Verlauf sowohl eine Zunahme als auch Abnahme des BIC zeigten. Dies könnte durch Remodellingvorgänge bedingt sein, die ja durch einen fortwährenden Knochenabbau und -aufbau charakterisiert sind [100-103, 123]. Eine mögliche Erklärung für den divergierenden Kurvenverlauf zwischen den verschiedenen Beschichtungen ist der unterschiedliche biologische Einfluss der Oberflächenbeschichtungen.

Interessanterweise wies coll/bFGF am 28. Tag post implantationem, auch wenn der Unterschied zu den anderen Beschichtungen nicht signifikant war ($p = 0,068$), prozentual mit Abstand das höchste BIC (74,0 %) auf. Bis zum 56. Tag nach der Implantation war dann aber eine Abnahme des BIC auf 60,3 % zu verzeichnen, was ebenfalls auf Remodellingprozesse zurückzuführen sein könnte. Vor dem Hintergrund des hohen BIC-Wertes am 28. Tag post implantationem und der allgemein angestrebten Frühbelastbarkeit dentaler Implantate könnte bFGF – unter Vorbehalt der Ergebnisse weiterer Studien – zukünftig von Interesse sein.

Am 56. Tag post implantationem wurden die höchsten BIC für die Kontrolle (76,0 %), coll (75,0 %) und coll/3er-combi (75,0 %) ermittelt. Signifikanzen wurden nicht festgestellt ($p = 1, 0,593, 0,068, 0,068$ bzw. $0,068$).

Bei Betrachtung des 28. und 56. Tages nach Implantatinserktion weisen interessanterweise, auch wenn nicht in signifikantem Maße, alle Beschichtungen, abgesehen von coll/bFGF am 28. Tag post implantationem, niedrigere BIC auf als die unbeschichtete Kontrolle. Eine mögliche Erklärung könnte die Tatsache sein, dass infolge von Interaktionen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix eine Inaktivierung von auf Implantatoberflächen präintegrierten Wachstumsfaktoren resultieren kann. Derartige Wechselwirkungen sind beispielsweise für BMP beschrieben [124-126].

Letztendlich muss trotz der ermittelten Unterschiede des BIC festgestellt werden, dass in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle keine signifikanten Abweichungen für irgendeine der untersuchten Beschichtungen messbar waren.

5.4 Schlußfolgerung

Zusammenfassend ist zu resümieren, dass abgesehen von FGF am 28. Tag nach Implantatinserterion, keine der Beschichtungen gegenüber der unbeschichteten Kontrolle vorteilhaft scheint. Eine mikrostrukturierte Implantatoberfläche allein scheint ausreichend, um das im Rahmen einer Implantatinserterion entstehende Blutkoagel an der Oberfläche zu fixieren [99] und nachfolgend eine osteokonduktive Migration von undifferenzierten Bindegewebszellen und differenzierten osteogenetischen Zellen zu stimulieren. Vor diesem Hintergrund ist, natürlich vorbehaltlich weiterer Studien, eine Beschichtung von dentalen Implantaten mit Zytokinen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix in Anbetracht des Aufwands und der Kosten, die damit verbunden sind, kritisch zu betrachten. Abgesehen hiervon ist, auch unter Berücksichtigung von Studien, in denen solche Beschichtungen als viel versprechend beschrieben werden [89, 127, 128], auf Grund der Tatsache, dass die Erfolgsrate von Implantaten derzeit mit bis zu 95 % [15-18] angegeben wird zu hinterfragen, ob eine derartige Implantatoberflächenmodifikation sinnvoll ist. Dies gilt vor allem für Situationen, in denen eine ausreichend hohe Knochenqualität gegeben ist. Für bestrahlten Knochen und andere Knochen minderer Qualität dagegen sollte, insbesondere vor dem Hintergrund einer allgemein angestrebten zeitlich komprimierteren kaufunktionellen Rehabilitation von Patienten mit einem schlechten Knochenlager, in weiteren Studien der Nutzen solcher Beschichtungen validiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Bottini DJ, Gentile P, Colicchia G, Grimaldi M, Trimarco A, Cervelli V. Alternative techniques in reconstructive surgery: bone-anchored extraoral implants for burn cases. *Aesthetic Plast Surg*, 2008. 32(1): p. 58-62; discussion 63-5.
2. Karayazgan B, Gunay Y, Atay A, Noyun F. Facial defects restored with extraoral implant-supported prostheses. *J Craniofac Surg*, 2007. 18(5): p. 1086-90.
3. Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Eitner S, Wiltfang J, Rupprecht S. Clinical trial of modified ankylos implants for extraoral use in cranio- and maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2004. 19(5): p. 716-20.
4. Arcuri MR and Rubenstein JT. Facial implants. *Dent Clin North Am*, 1998. 42(1): p. 161-75.
5. Neukam FW, Hausamen JE, Handel G, Scheller H. [Osseointegrated implants for the retention of restorative jaw prostheses and facial prostheses for functional and esthetic rehabilitation following tumor surgery]. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir*, 1989. 13(5): p. 353-6.
6. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerberg A. *Int Dent J*, 2003. 53(6 Suppl 2): p. 409-43.
7. Chen ST, Wilson Jr. TG and Hammerle CH. Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2004. 19 Suppl: p. 12-25.
8. Quirynen M, Van Assche N, Botticelli D, Berglundh T. How does the timing of implant placement to extraction affect outcome? *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2007. 22 Suppl: p. 203-23.
9. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*, 1981. 52(2): p. 155-70.
10. Romanos GE. Present status of immediate loading of oral implants. *J Oral Implantol*, 2004. 30(3): p. 189-97.

11. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Interventions for replacing missing teeth: different times for loading dental implants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(2): p. CD003878.
12. Nkenke , Fenner M. Indications for immediate loading of implants and implant success. *Clin Oral Implants Res*, 2006. 17 Suppl 2: p. 19-34.
13. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1969. 3(2): p. 81-100.
14. Schroeder A, Pohler O and Sutter F. [Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*, 1976. 86(7): p. 713-27.
15. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*, 1981. 10(6): p. 387-416.
16. Ferrigno N, Laureti M, Fanali S, Grippaudo G. A long-term follow-up study of non-submerged ITI implants in the treatment of totally edentulous jaws. Part I: Ten-year life table analysis of a prospective multicenter study with 1286 implants. *Clin Oral Implants Res*, 2002. 13(3): p. 260-73.
17. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res*, 1997. 8(3): p. 161-72.
18. Romeo E, Lops D, Margutti E, Ghisolfi M, Chiapasco M, Vogel G. Long-term survival and success of oral implants in the treatment of full and partial arches: a 7-year prospective study with the ITI dental implant system. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2004. 19(2): p. 247-59.
19. Duchna HW, Nowack U, Merget R, Muhr G, Schultze-Werninghaus G. [Prospective study of the significance of contact sensitization caused by metal implants]. *Zentralbl Chir*, 1998. 123(11): p. 1271-6.
20. Johansson CB, Han CH, Wennerberg A, Albrektsson T. A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1998. 13(3): p. 315-21.

21. Han CH, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T. Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clin Oral Implants Res*, 1998. 9(1): p. 1-10.
22. Velich N, Kádár B, Kiss G, Kovács K, Réti F, Szigeti K, Garagiola U, Szabó G. Effect of human organism on the oxide layer formed on titanium osteosynthesis plates: a surface analytical study. *J Craniofac Surg*, 2006. 17(6): p. 1144-9.
23. De Maezta MA, Alava J, and Gay-Escoda C. Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants. *Clin Oral Implants Res*, 2003. 14(1): p. 57-62.
24. Wheeler DL, Stokes KE, Hoellrich RG, Chamberland DL, McLoughlin SW. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J Biomed Mater Res*, 1998. 41(4): p. 527-33.
25. Mattioli-Belmonte M, Mengucci P, Specchia N, Gobbi G, Dubini S, Simonelli L, Greco F, Majni G, Biagini G, Rizzoli C. An experimental study in X-ray spectroscopy of the zirconium (Ca-PSZ) - bone interface. Microanalytic evaluation of the osteogenetic response. *J Mater Sci Mater Med*, 1997. 8(2): p. 85-90.
26. Puleo DA and Thomas MV. Implant surfaces. *Dent Clin North Am*, 2006. 50(3): p. 323-38, v.
27. Stanford CM. Surface modifications of dental implants. *Aust Dent J*, 2008. 53 Suppl 1: p. S26-33.
28. Muhlemann HR. [Microstructure of the surfaces of dental implantations]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*, 1975. 85(1): p. 97-112.
29. Harle J, Salih V, Olsen I, Brett P, Jones F, Tonetti M. Gene expression profiling of bone cells on smooth and rough titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*, 2004. 15(11): p. 1255-8.
30. Ogawa T, Sukotjo C, Nishimura I. Modulated bone matrix-related gene expression is associated with differences in interfacial strength of different implant surface roughness. *J Prosthodont*, 2002. 11(4): p. 241-7.
31. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*, 2003. 82(5): p. 372-6.

-
32. Ramires PA, Wennerberg A, Johansson CB, Cosentino F, Tundo S, Milella E. Biological behavior of sol-gel coated dental implants. *J Mater Sci Mater Med*, 2003. 14(6): p. 539-45.
 33. Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. *Biomaterials*, 2005. 26(3): p. 327-37.
 34. Ong JL and Chan DC. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. *Crit Rev Biomed Eng*, 2000. 28(5-6): p. 667-707.
 35. Turunen T, Peltola J, Makkonen T, Helenius H, Yli-Urpo A. Bioactive glass granules and polytetrafluoroethylene membrane in the repair of bone defects adjacent to titanium and bioactive glass implants. *J Mater Sci Mater Med*, 1998. 9(7): p. 403-7.
 36. Martini D, Fini M, Franchi M, Pasquale VD, Bacchelli B, Gamberini M, Tinti A, Taddei P, Giavaresi G, Ottani V, Raspanti M, Guizzardi S, Ruggeri A. Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants. *Biomaterials*, 2003. 24(7): p. 1309-16.
 37. Novaes AB Jr, Souza SL, de Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2002. 17(3): p. 377-83.
 38. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*, 2007. 23(7): p. 844-54.
 39. Meirelles L, Currie F, Jacobsson M, Albrektsson T, Wennerberg A. The effect of chemical and nanotopographical modifications on the early stages of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2008. 23(4): p. 641-7.
 40. Alzubaydi TL, Alameer SS, Ismaeel T, Alhijazi AY, Geetha M. In vivo studies of the ceramic coated titanium alloy for enhanced osseointegration in dental applications. *J Mater Sci Mater Med*, 2008.
 41. Dalton JE and Cook SD. In vivo mechanical and histological characteristics of HA-coated implants vary with coating vendor. *J Biomed Mater Res*, 1995. 29(2): p. 239-45.

-
42. French HG, Cook SD, Haddad Jr. RJ. Correlation of tissue reaction to corrosion in osteosynthetic devices. *J Biomed Mater Res*, 1984. 18(7): p. 817-28.
 43. Whitehead RY, Lacefield WR, Lucas LC. Structure and integrity of a plasma sprayed hydroxylapatite coating on titanium. *J Biomed Mater Res*, 1993. 27(12): p. 1501-7.
 44. Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, Hanisch U, Scharnweber D, Worch H, Zwipp H, Biewener A. Coating of titanium implants with type-I collagen. *J Orthop Res*, 2004. 22(5): p. 1025-34.
 45. Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Roessler S, Sewing A. Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. *Clin Oral Implants Res*, 2005. 16(5): p. 563-9.
 46. Stadlinger B, Pilling E, Mai R, Bierbaum S, Bernhardt R, Scharnweber D, Eckelt U. Effect of biological implant surface coatings on bone formation, applying collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and growth factors. *J Mater Sci Mater Med*, 2008. 19(3): p. 1043-9.
 47. Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res*, 1996. 32(1): p. 55-63.
 48. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*, 1995. 29(3): p. 389-401.
 49. Becker D, Geissler U, Hempel U, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res*, 2002. 59(3): p. 516-27.
 50. Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res*, 1995. 216(1): p. 35-45.

-
51. Schlegel KA, Sindet-Pedersen S, Hoepffner HJ. Clinical and histological findings in guided bone regeneration (GBR) around titanium dental implants with autogenous bone chips using a new resorbable membrane. *J Biomed Mater Res*, 2000. 53(4): p. 392-9.
 52. Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti FH Jr. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent*, 2000. 9(2): p. 126-31.
 53. Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol*, 2006. 77(1): p. 73-80.
 54. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Wichmann M, Schlegel KA, Holst S, Thorwarth M. Expression of interleukin 1-beta, transforming growth factor beta-1, and vascular endothelial growth factor in soft tissue over the implant before uncovering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006. 101(5): p. 565-71.
 55. Schlegel KA, Thorwarth M, Plesinac A, Wiltfang J, Rupprecht S. Expression of bone matrix proteins during the osseous healing of topical conditioned implants: an experimental study. *Clin Oral Implants Res*, 2006. 17(6): p. 666-72.
 56. Schlegel KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2003. 18(1): p. 53-8.
 57. Hönig JH, Merten HA. Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der humanmedizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl Implantol* 1993; 2: p. 237-43.
 58. Schweiberer L, Eitel F. Bone transplantation in animals and man, In: Altman H, Büchner F, Cottier H, Grundmann E, Holle G, Letterer E et al., editors. *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, VI ed. Berlin: Springer Verlag; 1977: p. 617-54
 59. Wiltfang J, Merten HA, Hönig JH. Histomorphometrische Untersuchung des Einheilverhaltens verschiedener extraoraler Implantatsysteme. *Z Zahnärztl Implantol* 1998; 14: p. 40-5

60. Jump EB, Weaver ME. The miniature pig in dental research. Swine in biomedical research. Proc Int Symp Richland Washington 1965; p. 543-57
61. Laiblin C, Jaeschke G. Klinisch-chemische Untersuchungen des Knochen- und Muskelstoffwechsels unter Belastung beim Göttinger Miniaturschwein - eine experimentelle Studie. Berl Münch Tierärztl Wschr 1979; 92: p. 124-8
62. Merten HA, Hönig JH, Luhr HG. Die Architektur des keramo-ossären Verbund-Regenerates in Abhängigkeit von Form und Kompaktierung der HA-Granula. Tierexperimentelle histomorphologische Ergebnisse beim Göttinger Minischwein. Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 1993; 17: p. 275-80
63. Hönig JF, Merten HA, Wiltfang J. Significance of the periosteum in onlay cranio-facial augmentation. J Craniofac Surg 1998; 9: p. 260-6
64. Cohen S and Taylor J.M. Epidermal growth factor: chemical and biological characterization. Symp Soc Dev Biol, 1974. 30(0): p. 25-42.
65. Hughes SE. Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. J Histochem Cytochem, 1997. 45(7): p. 1005-19.
66. Eswarakumar VP, Lax I., Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. 16(2): p. 139-49.
67. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. 16(2): p. 233-47.
68. Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. J Biol Chem, 1975. 250(7): p. 2515-20.
69. Gimenez-Gallego G, Conn G, Hatcher VB, Thomas KA. Human brain-derived acidic and basic fibroblast growth factors: amino terminal sequences and specific mitogenic activities. Biochem Biophys Res Commun, 1986. 135(2): p. 541-8.
70. Ferrara N and Henzel W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 1989. 161(2): p. 851-8.
71. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. Exs, 2005(94): p. 209-31.

-
72. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol*, 2007. 2: p. 251-75.
 73. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol*, 2005. 128(3): p. 303-9.
 74. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development*, 2004. 131(9): p. 2161-71.
 75. Moldovan L and Moldovan NI. Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. *Exs*, 2005(94): p. 127-46.
 76. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, 2007. 49(10): p. 1015-26.
 77. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004. 22(4): p. 233-41.
 78. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965. 150(698): p. 893-9.
 79. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 1994. 127(6 Pt 1): p. 1755-66.
 80. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*, 2002. 23(6): p. 787-823.
 81. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, 2002. 27(16 Suppl 1): p. 2-8.
 82. Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, Furukawa K, Shibata Y, Moriishi T, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Mizuno A, Yamaguchi A. Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2. *Bone*, 2003. 32(5): p. 502-12.
 83. Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N, Yamaguchi A. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone*, 2004. 34(6): p. 993-1003.

-
84. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, Wozney JM, Li XJ. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res*, 1998. 13(9): p. 1483-90.
 85. Urist MR, Lietze A, Mizutani H, Takagi K, Triffitt JT, Amstutz J, DeLange R, Termine J, Finerman GA. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin Orthop Relat Res*, 1982(162): p. 219-32.
 86. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988. 242(4885): p. 1528-34.
 87. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(24): p. 9484-8.
 88. Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem*, 1996. 237(1): p. 295-302.
 89. Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Tani Y, Iizuka T. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1999. 37(1): p. 2-5.
 90. Urist MR and Ibsen KH. Chemical Reactivity of Mineralized Tissue with Oxytetracycline. *Arch Pathol*, 1963. 76: p. 484-96.
 91. Rahn BA and Perren SM. Calcein blue as a fluorescent label in bone. *Experientia*, 1970. 26(5): p. 519-20.
 92. Rahn BA and Perren SM. Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol*, 1971. 46(3): p. 125-9.
 93. Rahn BA, Perren SM. [Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling]. *Experientia*, 1972. 28(2): p. 180.
 94. Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg Am*, 1958. 40-A(4): p. 897-910.
 95. Miller EJ, Gay S. The collagens: An overview and update. *Methods Enzymol*, 1987. 144: p. 3-41.

96. Matsui Y, Neukam FW, Wichmann M, Ohno K. A computerized method for evaluating distribution of occlusal load on implant-supported fixed cantilever prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1996. 11(1): p. 67-72.
97. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*, 1981. 9: p. 15-25
98. Strub JR, Türp JC, Witkowski S, Hürzeler MB, Kern M. Einführung in die dentale Implantologie. Strub, J.R., Türp, J.C., Witkowski, S., Hürzeler, M.B., Kern, M. Curriculum Prothetik. Bänder I-III. 1. Aufl., 1994, Quintessenz, Berlin, ISBN 3-87652-522-X; Band III: p. 1069-163.
99. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*, 1998. 11: p. 391-401.
100. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000; 17: p. 22-35
101. Frost HM. Bone remodelling dynamics. CC Thomas, Springfield, IL, 1963.
102. Roberts WE. Bone tissue interface. *J Dent Educ*, 1988. 52: p. 804-9.
103. Brunski JB. Influence of biomechanical factors at the bone-biomaterial interface. In: (Ed.), I.D.J.: *The Bone-Biomaterial Interface*, 1991. p. 391-405. Univ Toronto Press, Toronto
104. Osborn, JF. [Biomaterials and their application to implantation]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*, 1979. 89: p. 1138-9.
105. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20: p. 185-206.
106. Park JM, Koak JY, Jang JH, Han CH, Kim SK, Heo SJ. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2006. 21: p. 859-66.
107. Franke Stenport V, Johansson CB, Sawase T, Yamasaki Y, Oida S. FGF-4 and titanium implants: a pilot study in rabbit bone. *Clin Oral Implants Res*, 2003. 14: p. 363-8.

-
108. Boyan BD, Lohmann CH, Somers A, Niederauer GG, Wozney JM, Dean DD, Carnes DL Jr., Schwartz Z. Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* Jul, 1999. 46: p. 51-9.
 109. Gao T., Lindholm TS, Marttinen A, Puolakka T. Bone inductive potential and dose-dependent response of bovine bone- morphogeneticprotein combined with type IV collagen carrier. *Ann. Chir. Gynaecol. Suppl*, 1993. 207: p. 77-84.
 110. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998. 31: p. 303-18.
 111. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin. Orthop*, 1999. 367: p. 95-106.
 112. Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng*, 1999. 5: 53-65.
 113. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 2005. 26: 2575-84.
 114. Bernhardt R, van den Dolder J, Bierbaum S, Beutner R, Scharnweber D, Jansen J, Beckmann F, Worch H. Osteoconductive modifications of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR muCT and histology. *Biomaterials* 2005: 26: 3009-19.
 115. Matin K, Senpuku H, Hanada N, Ozawa H, Ejiri S. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 around immediate implants: a pilot study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Mar-Apr;18(2): 211-7.
 116. Ripamonti U, Duneas N, Van Den Heever B, Bosch C, Crooks J. Osteoconductive modifications of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR muCT and histology. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(16): 3009-19.
 117. Bryant SR. The effects of age, jaw site, and bone condition on oral implant outcomes. *Int J Prosthodont.* 1998 Sep-Oct;11(5): 470-90.

118. Bragdon CR, Doherty AM, Rubash HE, Jasty M, Li XJ, Seeherman H, Harris WH. The efficacy of BMP-2 to induce bone ingrowth in a total hip replacement model. Clin Orthop Relat Res. 2003 Dec;(417): 50-61.
119. Hanisch O, Sorensen RG, Kinoshita A, Spiekermann H, Wozney JM, Wikesjö UM. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dehiscence defects with non-submerged immediate implants: an experimental study in Cynomolgus monkeys. J Periodontol. 2003 May;74(5): 648-57.
120. Naish SJ. Handbuch immunchemischer Färbemethoden II. Übersetzung: Mally M., Stankic I. Broschüre, DAKO Corporation, Carpinteria, USA (1989).
121. Parr JA, Young T, Dunn-Jena P, Garetto LP. Histomorphometrical analysis of the bone-implant interface: comparison of microradiography and brightfield microscopy. Biomaterials 1996; 17: 1921-6.
122. U. Eckelt, E. Pilling, R. Mai, M. Huhle, S. Bierbaum, R. Bernhardt, D. Scharnweber, E. Kuhlisch, U. Hempel, B. Stadlinger. Beschleunigte Osseointegration durch Implantatbeschichtungen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Z Zahnärztl Impl, 2007;23(2): 101-11.
123. Brånemark, P.I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O., Ohman, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand J Plast Reconstr Surg Suppl 1977. 16: 1-132.
124. Andres JL, DeFalcis D, Noda M, Massagué J. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. J Biol Chem. 1992 Mar 25;267(9): 5927-30.
125. Bahat O. Brånemark system implants in the posterior maxilla: clinical study of 660 implants followed for 5 to 12 years. Int J Oral Maxillofac Implants. 2000 Sep-Oct;15(5): 646-53.
126. Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Itoh N, Reddi AH, Kimata K. Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. J Biol Chem. 2004 Mar 26;279(13):1346-54. Epub 2004 Jan 5.
127. Reyes CD, Petrie TA, Burns KL, Schwartz Z, Garcia AJ. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. Biomaterials 2007; 28: 3228-35.

128. Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone*. 2002 Jun;30(6): 816-22.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michelle Klos, geb. Schmidt
 Geboren am: 20.02.1977 in Bergheim (Erft)
 Familienstand: verheiratet, 1 Tochter
 Wohnhaft in: 07743 Jena, Freiligrathstr. 72 a

Schulausbildung

09/ 1996 – 06/ 1999 Hermann Lietz-Schule Spiekeroog;
 (Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote sehr gut)

Studium

10/ 1999 – 09/ 2005 Humanmedizinstudium an der Friedrich Schiller-Universität Jena
 10/ 2005 Erlangung der ärztlichen Approbation (Note: gut)
 10/ 2005 – 07/ 2009 Zahnmedizinstudium an der Friedrich Schiller-Universität Jena
 10/ 2009 Erlangung der zahnärztlichen Approbation (Note: sehr gut)

Stipendium

04/ 2000 – 10/ 2005 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

Promotion

04/2007 Erlangung des akademischen Grades Dr. med. (Note: summa cum laude)

Beruflicher Werdegang

seit 12/ 2005 Assistenzärztin an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie der FSU Jena

Michelle Klos

Ehrenwörtliche Erklärung

Vorbemerkung (vergleiche III. Vorbemerkung, Seite IV):

Die Planung, Vorbereitung und Durchführung der Studie erfolgten durch Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau während seines Beschäftigungsverhältnisses als Oberarzt an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg in dem Zeitraum 2003 bis 2005. Bei der Durchführung der Prozeduren an den Versuchstieren assistierte ihm Herr Prof. Dr. Dr. Karl Andreas Schlegel. Die Aufarbeitung der Prüfkörper sowie die Herstellung der auszuwertenden Präparate wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau von medizinisch-technischen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau im Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

Die Auswertung der Präparate sowie das Aufstellen und die Interpretation der Ergebnisse wurden mir, Dr. Michelle Klos, von Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau im Rahmen meiner zweiten Dissertation 2008 übertragen.

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat:

Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen

Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum, Unterschrift des Verfassers

Danksagung

Ich danke allen, die durch ihre Mitarbeit und freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau für die Überlassung des Studienmaterials, die Betreuung der Promotion, die sachliche Kritik und die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertationsschrift.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Karl Andreas Schlegel und den Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Bereitstellung der Infrastruktur und die Aufarbeitung der Prüfkörper sowie die Herstellung der auszuwertenden Präparate.